

Tesis de Posgrado

Aspectos moleculares de la regulación de la función tiroidea

Pregliasco, Laura Beatriz

1995

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pregliasco, Laura Beatriz. (1995). Aspectos moleculares de la regulación de la función tiroidea. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2774_Pregliasco.pdf

Cita tipo Chicago:

Pregliasco, Laura Beatriz. "Aspectos moleculares de la regulación de la función tiroidea". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1995.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2774_Pregliasco.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

♦UNIVERSIDAD de BUENOS AIRES♦
FACULTAD de CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

**ASPECTOS MOLECULARES
DE LA REGULACION DE LA
FUNCION TIROIDEA**

LAURA B. PREGLIASCO

Directores

GUILLERMO J. JUVENAL
MARIO A. PISAREV

Lugar de Trabajo

División Bioquímica Nuclear,
Centro Atómico Ezeiza,
Comisión Nacional
de Energía Atómica

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

♦1995♦

72

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento y especial reconocimiento al Dr Guillermo J. Juvenal, quien me inició y orientó en el campo de la investigación científica, por su estímulo permanente, su apoyo y su confianza.

Al Dr Mario A. Pisarev, por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación científica, por su indispensable orientación, su paciencia y su presencia estimulante.

A Ruth, que es parte fundamental de este trabajo, por sus críticas polémicas y docentes, por su solidaridad a toda prueba y por su amistad; quien me enseñó lo necesario para ordenar las ideas y poner empeño en algo más que la tesis.

A Laura, con quien la travesía cotidiana se transformaba un recreo, por los Taragüí y las discusiones, por su apoyo indispensable y su amistad.

A mis compañeros de división: León, Gaby, Mariana ricotera, Ricardo, Daniel, Guillermo y Soria, quienes supieron aguantarme en los buenos y en los malos días, y me brindaron su colaboración imprescindible para que este trabajo pudiera concretarse.

A Patri, Oti, Andrea, Ritaco, Norma, Docteurs, Juárez, María Elisa, Elizabeth, Carlitos, Gustavo, Hinako, Graciela, Mónica, Iris, Diana, Charito, Basili y Catalani, compañeros del destierro en Ezeiza.

A Carina, Néstor, Ethel, Alejandro y al Dr Alberto Baldi, por las transferencias y su cálida colaboración.

Al Dr Daniel Cardinali por su asesoramiento y a Javier por las operaciones.

Al Dr Omar Pignataro por el RIA para AMPc.

A Marcelo y el Kalpa por la lectura crítica de parte de este trabajo.

A los amigos del alma: Darío, Ernesto, Adalí, Elena y Ruth; y a Güili, mi hermanito mayor, porque a pesar de los eventuales distanciamentos (los que se miden en km y de los otros) siempre estuvieron presentes en lo mejor de mis intentos.

A Paula y el Kalpa, fugaces compañeros ingebianos, por su afectuoso estímulo durante el doloroso parto de esta escritura.

A mis familiares y amigos.

*Al agua
(quieta o turbulenta)*

A Eduardo



En ese instante sutil en que el hombre vuelve sobre su vida, Sísifo regresando a su roca, contempla esa serie de actos inconexos que devienen su destino, creado por él, unido bajo la mirada de su memoria y en seguida sellado por su muerte. Así, persuadido del origen completamente humano de todo lo que es humano, ciego que desea ver y sabe que la noche no tiene fin, está siempre en marcha. La roca todavía rueda. Abandono a Sísifo al pié de la montaña! Siempre torna a encontrar su fardo. Mas Sísifo enseña la fidelidad superior que niega los dioses y conmueve las rocas. El mismo juzga que todo está bien. Ese universo, en adelante sin dueño, no le parece ni estéril ni fútil. Cada grano de esa roca, cada destello mineral de esa montaña, plena de noche, para él forma un mundo. La propia lucha hacia la cumbre basta para henchir el corazón de un hombre. Hay que imaginar a Sísifo dichoso.

Albert Camus, *Le Mythe de Sisyphe*

INTRODUCCION



LA GLANDULA TIROIDES

La tiroides es una glándula cuya secreción endócrina contiene compuestos iodados, a través de los cuales actúa como un importante regulador del metabolismo, el crecimiento y la morfogénesis (1).

La incorporación de iodo a proteínas y la síntesis de hormonas tiroideas son procesos que aparecen tempranamente en la evolución. Desde un punto de vista filogenético, se ha sugerido que la tiroides constituye la glándula endócrina mas antigua (2). Ya en los invertebrados es posible detectar estructuras capaces de sintetizar e hidrolizar proteínas iodadas que contienen hormonas tiroideas. En el *anfioxus* las proteínas iodadas se concentran en el endostilo, y durante la metamorfosis del *amocetes* se cierra la apertura del endostilo con formación de folículos endócrinos, estructura básica de la tiroides de los vertebrados (Figura 1) (3).

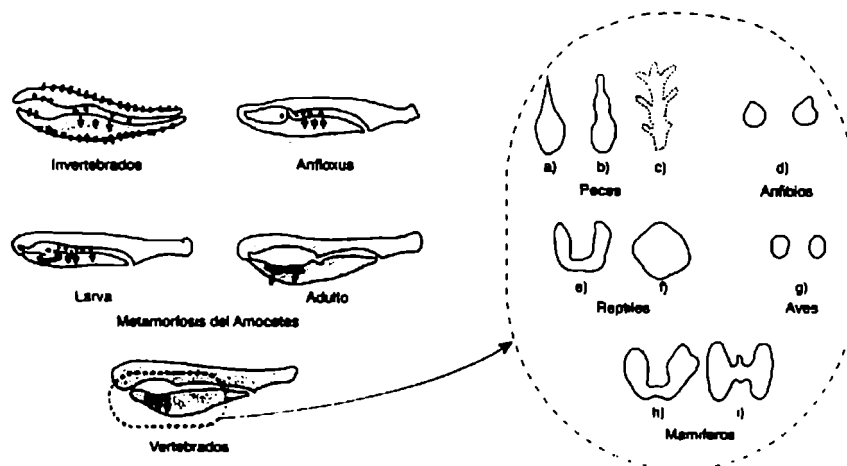


Figura 1. Evolución de las estructuras en las que se sintetizan e hidrolizan proteínas iodadas que contienen hormonas tiroideas. En los invertebrados se iodinan escleroproteínas, algunas de las cuales son digeridas en el tracto gastrointestinal. En el *anfioxus* la absorción de iodo se realiza en una región del endostilo, y en el *amocetes* se forman folículos endócrinos, por una evaginación del endostilo. La glándula tiroidea de los vertebrados puede estar formada por folículos difusos, o constituida por diversas formas encapsuladas: a) elasmobranquios, b) algunos teleosteros, c) la mayoría de los teleosteros, d) rana, e) lagartija, f) tortuga, g) gallina, h) ratón, i) hombre.

En los mamíferos, el parénquima tiroideo es de origen principalmente endodérmico, y se forma a partir de un esbozo mediano en la pared ventral de la faringe primitiva (tubérculo tiroideo), que crece caudalmente hasta ponerse en contacto con los grandes vasos del cuello. El esbozo tiroideo en su descenso queda unido a la faringe por un tallo hueco denominado conducto tirogloso que se atrofia completamente antes del nacimiento. Este parénquima también incluye estructuras epiteliales derivadas de los últimos cuerpos branquiales y su tejido conectivo es de origen mesenquimático (4).

La tiroides humana pesa entre 20 y 40 gramos y está formada por dos lóbulos laterales apoyados en los primeros anillos traqueales, unidos por un istmo mediano de grosor variable (Figura 2) (5). La tiroides de la rata adulta pesa de 5 a 10 mg cada lóbulo, los que se encuentran claramente separados a cada lado de la tráquea, de forma tal que el istmo que los une no se observa a simple vista.

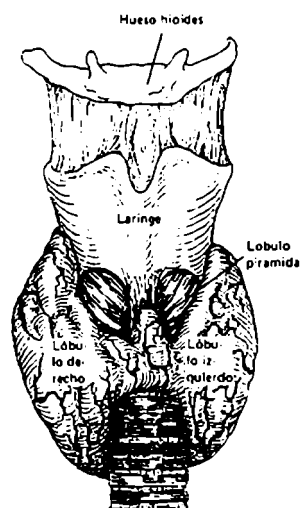


Figura 2. La Glándula Tiroides Humana

El tejido tiroideo está compuesto principalmente por células epiteliales, llamadas foliculares o tirocitos (70%), organizadas en folículos, y por el tejido mesenquimático de soporte: las células endoteliales de los vasos capilares (20%) y fibroblastos (10%). Un número escaso de células secretoras de calcitonina (o células "C") se encuentra localizado en la periferia de los folículos (6). El acino o folículo tiroideo constituye la unidad anátomo-funcional de la glándula. Esta estructura esférica está formada por una monocapa de células

foliculares que segregan y depositan en la cavidad que determinan (o luz del folículo) el coloide tiroideo, cuyo principal constituyente es una glicoproteína iodada: la tiroglobulina (Tg). Entre los folículos se encuentra el tejido intersticial o estroma conectivo, donde transcurren vasos y nervios. Así, la membrana basal



Figura 3. Histología Tiroidea
Corte de tiroides de rata (x 179)

de las células foliculares se encuentra en contacto con los capilares sanguíneos y su membrana apical con el coloide intra-folicular. La forma, tamaño y distribución de los folículos dentro de la glándula es muy variable (7, 8) (Figura 3).

La tiroides constituye el órgano endócrino más ricamente vascularizado (9, 10). Por otro lado, mediante diversas aproximaciones experimentales se ha demostrado que esta glándula se encuentra innervada, fundamentalmente por tres sistemas: 1) las neuronas nor-adrenérgicas simpáticas, cuyos somas

están localizadas en el ganglio cervical inferior y/o medio (GCI y GCM), que se proyectan hacia la tiroides a través del ganglio cervical superior (GCS) y el nervio carotídeo externo (11, 12, 13); 2) el sistema constituido por las neuronas colinérgicas parasimpáticas situadas en ganglios locales, que reciben la descarga preganglionar del vago (14, 15, 16, 17); y 3) las neuronas peptidérgicas, en su mayoría localizadas en ganglios locales. Se ha demostrado la presencia de péptido vasoactivo intestinal (VIP) (18, 19), sustancia P (20) y neuropéptido Y (21), en la proximidad de las células foliculares y de los capilares sanguíneos tiroideos, de numerosas especies (Figura 4).

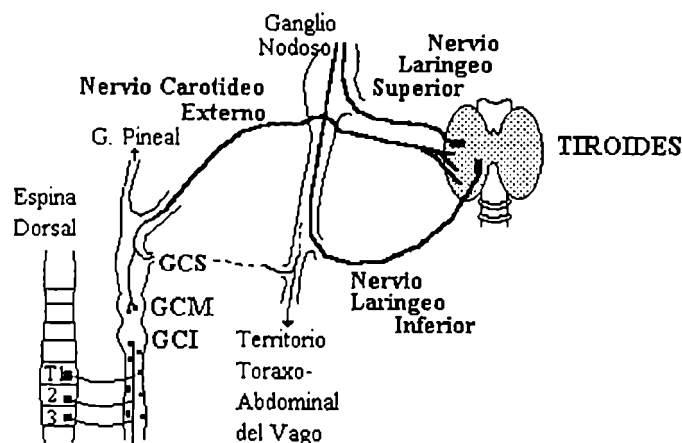


Figura 4. Esquema de la inervación autónoma de la glándula tiroidea. Se representan los ganglios de la cadena simpática (el ganglio cervical superior: GCS, medio: GCM e inferior: GCI)

1. Las Hormonas Tiroideas

Las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) cumplen un rol fundamental en la regulación del metabolismo intermedio, virtualmente, de todos los tejidos (9, 10) y son esenciales en el crecimiento y maduración del sistema nervioso del feto y del recién nacido (9, 10, 22). La mayoría de los amplios efectos de las hormonas tiroideas en el organismo son consecutivos a la estimulación del consumo de oxígeno, si bien también participan en la regulación del metabolismo de los lípidos, incrementan la absorción de carbohidratos en el intestino y aumentan la disociación del oxígeno de la hemoglobina por un aumento del 2,3-difosfoglicerofosfato de los eritrocitos. En estas acciones, la T_3 es de 3 a 5 veces más potente que la T_4 , en tanto que la T_3 reversa resulta inactiva (1). La estructura química de estas hormonas, así como la de sus precursores, se representa en la Figura 5.

La síntesis y secreción de T_3 y T_4 es la principal función diferenciada de la glándula tiroides y constituye un proceso complejo que puede resumirse en las siguientes etapas (Figura 6):

I- Captación de iodo.

El iodo proveniente de la ingesta, es absorbido en el intestino y rápidamente alcanza el torrente sanguíneo. Aproximadamente el 33% es captado selectivamente por la tiroides y el resto se elimina por la orina. El mecanismo tiroideo de concentración de iodo posee un gran rendi-

miento; los niveles intraglandulares del halógeno pueden llegar a ser 20 a 40 veces superiores respecto de los niveles plasmáticos, en condiciones fisiológicas (23, 24, 25, 26). El primer paso de este proceso es la captación del iodo inorgánico del torrente sanguíneo, mediante un transportador activo asociado a una ATPasa dependiente de Na^+ y K^+ , cuya estructura molecular permanece aún desconocida (27). De acuerdo a lo sugerido por distintos autores, la entrada de iodo al intersticio celular ocurre en contra de un gradiente electroquímico (28, 29, 30). El ioduro captado es transportado a través del citoplasma hacia la membrana apical y se libera al lumen folicular, donde es sustrato en la reacción de iodinación de la Tg. Esta segunda movilización intramembrana se realiza por un mecanismo diferente al transporte activo de la membrana basal, y se encuentra favorecido

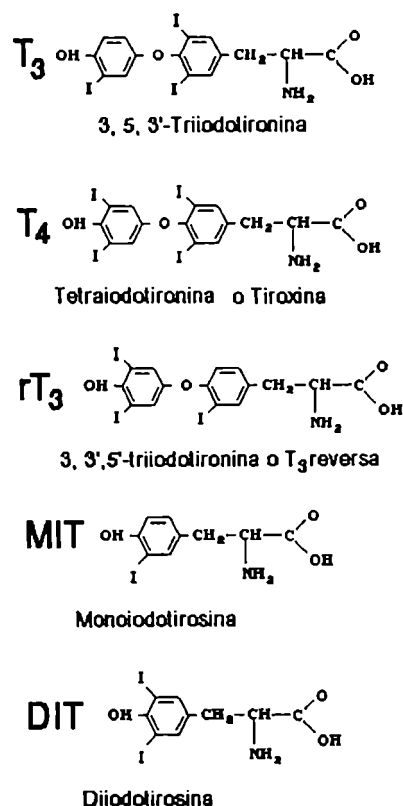


Figura 5. Estructura química de las hormonas tiroideas y sus precursores.

por el gradiente electroquímico (28, 29). Si bien no existe consenso al respecto, se ha postulado la existencia en la membrana apical, de un canal de I^- , sensible a la acción de distintos moduladores (31).

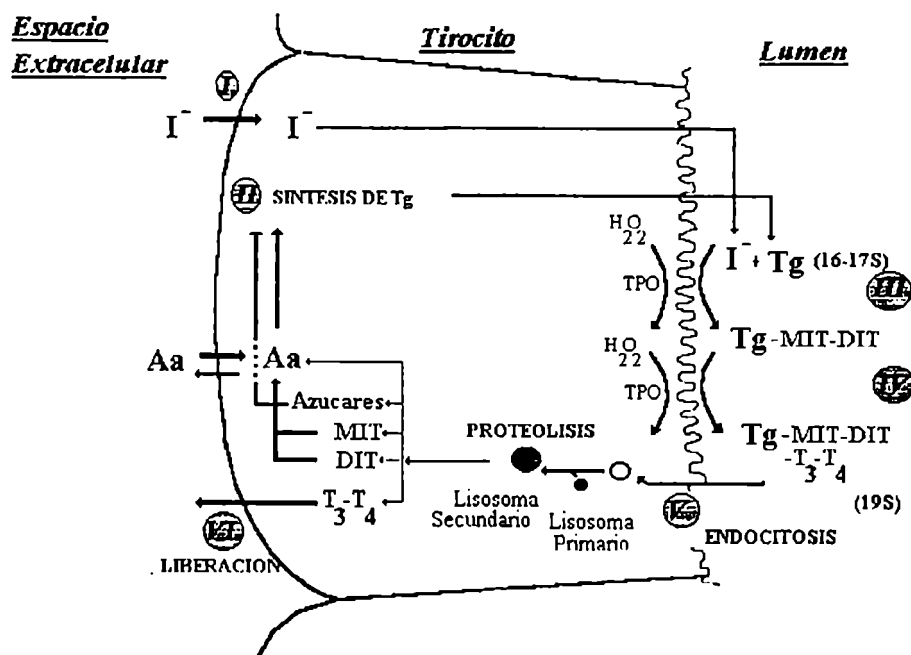


Figura 6. Esquema de la síntesis de las hormonas tiroideas

II- Síntesis y liberación de Tg al lumen folicular.

La Tg es la proteína mas abundante sintetizada por la glandula tiroides (32, 33). El locus completo del gen de la Tg se extiende por mas de 200 kilobases (kb) en distintas especies (humana, bovina, rata), y constituye uno de los genes de mayor tamaño que se conocen. Su unidad transcripcional comprende alrededor de 9 kb de material exónico (34) que dan origen a la especie de ARN mensajero (ARNm) mas abundante del tirocito (35). La Tg es una glicoproteína globular dimérica de gran peso molecular: 660.000 D, cuya estructura primaria monomérica comprende aproximadamente 3.000 aminoácidos, entre los que se encuentran alrededor de 120 tirosinas. La Tg recién sintetizada, en su trayecto hacia el lumen folicular atraviesa el retículo endoplasmático y el aparato de

Golgi, donde es glicosilada y adquiere su estructura dimérica final. Se ha postulado que la liberación de Tg al coloide se produce a través vesículas, formadas en esta última etapa de su maduración (36).

La importancia primaria de esta proteína en la biosíntesis de las hormonas tiroideas se evidencia en los bocios congénitos asociados a mutaciones en el gen de Tg, que alteran su capacidad hormonogénica (37, 38, 39). El estudio de la estructura genética de esta proteína ha demostrado una alta homología de su región carboxi-terminal con el gen de la acetilcolinesterasa (40, 41), lo que permitiría explicar la presencia de Tg inmunoreactiva en neuronas (42) y la patogénesis de la oftalmopatía en la enfermedad de Graves (43).

III y IV- Iodinación de la Tg y acoplamiento de iodotirosinas.

La iodinación de los residuos tirosina de la Tg y el acoplamiento de los mismos para formar las hormonas tiroideas, son reacciones catalizadas por la enzima tiroperoxidasa o peroxidasa tiroidea (TPO) (44). La TPO es una glicoproteína ligada a la membrana plasmática apical, con su dominio catalítico orientado hacia el lumen folicular (45, 46). Su estructura primaria fue deducida a partir del ADN copia (ADNc) de la TPO humana, clonada a fines de la década pasada (47, 48). Consiste en un oligopéptido de 933 aminoácidos, de un peso molecular de 102.937 D. Contiene una secuencia péptido-síñal de transmembrana en el extremo amino terminal y una región hidrófoba, 85 aminoácidos antes del extremo carboxi-terminal, que constituye el anclaje de la proteína a la membrana apical. La transcripción del gen que codifica a esta enzima resulta, por lo menos, en dos especies de ARNm generados por "splicing alternativo" de un único precursor, lo cual probablemente explique la heterogeneidad en los pesos moleculares hallados para esta proteína (49, 50, 51, 52)

Ha sido demostrado que la TPO también puede iodinar otras proteínas distintas de Tg, por ejemplo albúmina (53, 54). En este sentido, se ha informado que la iodinación de proteínas catalizada por la TPO purificada, o la enzima unida a membranas, o bien en sistemas celulares, no es una reacción específica (46). De acuerdo a esta hipótesis, dado que la Tg es la proteína más abundante en el lumen folicular, su iodinación sería preferencial. Sin embargo, Ossendorp y col (142) demostraron que la iodinación de proteínas puede ocurrir intracelularmente, probablemente en el aparato de Golgi, donde la Tg no es la proteína más abundante y aún así es el sustrato preferencial de la TPO.

El mecanismo catalizado por la TPO, de oxidación del yodo e incorporación a los residuos tirosina, aún no se encuentra totalmente aclarado. Sin embargo, se sabe que un sustrato fundamental para la reacción de organificación y de acoplamiento de los precursores ya iodinados es el H_2O_2 (56, 57, 58). Por otro lado, de las 122 tirosinas presentes en la estructura primaria de la Tg, se han identificados únicamente 12 tirosinas por monómero capaces de ser iodinadas, de las cuales 8 a 10 podrán acoplarse para formar las hormonas tiroideas (59, 60). Estos últimos se denominan "sitios hormonogénicos", y se han identificado los residuos "dadores" y "aceptores" en la reacción de acoplamiento para originar T_3 o T_4 (61, 62). Ambas reacciones, la de organificación y la de acoplamiento de iodotirosinas, son sensibles al tratamiento con tiourea, metiltiouracilo, tiouracilo, propiltiouracilo (PTU) y metilmercaptoimidazol (MMI), entre otros compuestos denominados "antitiroideos" (63, 64).

La trascendencia clínica de la TPO no solo reside en la importancia metabólica de las reacciones que cataliza, sino que además ha sido identificada como el principal componente antigénico involucrado en la destrucción autoinmune de la tiroides, en pacientes con tiroiditis de Hashimoto (65).

V - VII- Endocytosis, proteólisis de la Tg madura y liberación de hormonas tiroideas.

En la membrana apical del tirocito se encuentran presentes microvellosidades que favorecen el contacto entre la superficie del tirocito y el coloide, capaces de incluir por pinocytosis gran número de gotas de coloide (36). Por este mecanismo la Tg es nuevamente transportada dentro de la célula folicular, pero esta vez incluyendo en su estructura a las hormonas tiroideas. Una vez que la gota de coloide es incluida, se produce la migración de lisosomas primarios, los que se fusionan con las vesículas que contienen Tg y se forma el fagolisosoma o lisosoma secundario, donde ocurre la proteólisis enzimática. Como producto de esta degradación se producen T_3 y T_4 libres, MIT, DIT, aminoácidos y azúcares. Los precursores MIT y DIT son deshalogenados y reutilizados como el resto de los aminoácidos y azúcares para la síntesis *de novo* de proteínas celulares, mientras que las hormonas tiroideas, de gran permeabilidad, abandonan rápidamente el contenido lisosomal y son liberadas al torrente sanguíneo (66).

2. Regulación de la Función Tiroidea

La regulación de la función tiroidea fue, alguna vez, un ejemplo clásico del concepto: "una hormona - un tipo celular - un segundo mensajero intracelular, con efectos pleiotrópicos". Sin embargo, actualmente debe entenderse a los mecanismos moduladores de la función de cualquier tejido, como una compleja red de pasos regulatorios cruzados, en la cual las señales intra y extracelulares actúan sobre sus receptores como "bits" de información en un circuito electrónico, como señales sin un significado fisiológico definido *per se* (67). En el caso particular de la tiroides, a pesar de la acción generalizada y central de la tirotrófina (TSH) hipofisaria, se han identificado numerosos moduladores alterna-

tivos que afectan la función tiroidea, incluso modificando la respuesta a la TSH, y sobre los cuales haremos mención más adelante.

2.1. La tirotrofina

De acuerdo a la fisiología clásica, el modulador por excelencia de la secreción y el trofismo tiroideo es la TSH (68). Esta hormona es sintetizada por las células tiotropas que se encuentran localizadas en la región anteromedial de la adenohipófisis (69, 70). Es una glicoproteína de 28.000 D de peso molecular, constituida por dos subunidades, α y β , cada una por sí misma carente de actividad biológica. La subunidad β (110 aminoácidos, 15.600 D) es la que caracteriza a la TSH, dado que es la responsable de su especificidad biológica e inmunológica (1).

La síntesis y secreción de la TSH se encuentra bajo el control de diversas áreas del sistema nervioso central, siendo la mas importante la hipotalámica a través de la hormona liberadora de TSH: la TRH (71). Por otro lado, las hormonas tiroideas, provocan una disminución en la secreción de TSH, ejerciendo de este modo un control inhibitorio, predominantemente a nivel de la adenohipófisis. De esta manera se establece un balance entre ambos productos hormonales. Pequeños aumentos en la concentración de hormonas tiroideas circulantes inducen una caída en los niveles de TSH plasmática, y una disminución en los niveles séricos de estas iodotironinas provoca el correspondiente incremento en la concentración sérica de TSH (69, 70). Los efectos inhibitorios sobre la liberación de TSH en la adenohipófisis, son mediados por receptores con gran afinidad para T_3 (10 veces superior que para T_4) presentes en los núcleos de las células tiotropas (69, 70). Se ha demostrado que las hormonas tiroideas inhiben la secreción de TSH por diversos mecanismos:

- a- disminución de la síntesis de TSH, por inhibición de la síntesis de ARNm de las subunidades α y β (72),
- b- inhibición de la secreción de TSH (73),
- c- regulación negativa del número de receptores para TRH (74, 75), y
- d- inhibición de la síntesis de TRH (76).

La TSH unida a un receptor de membrana desencadena las señales intracelulares responsables de sus efectos biológicos (77, 78). Dependiendo de la especie involucrada, la TSH activa 1 o 2 sistemas de mensajeros intracelulares. En la tiroides canina o en una línea celular de tiroides de rata denominada FRTL-5 (por "Fisher Rat Thyroid Line"), la TSH activa fundamentalmente la cascada del AMPc, en el rango de concentraciones fisiológicas (79, 80, 81, 82). En concentraciones 3 órdenes de magnitud mayores activa la vía de los fosfoinosítidos, aunque este efecto es débil y, de acuerdo a ciertos autores, no puede excluirse la posibilidad de actividades contaminantes (83). Sin embargo, de acuerdo a Corda y col (84), la actividad coordinada de estos dos sistemas de señales intracelulares es necesaria para el correcto funcionamiento tiroideo. Por ejemplo, el yodo captado por el tirocito, es liberado hacia el lumen folicular mediante un mecanismo estimulable por TSH de manera AMPc-independiente, aparentemente ligado al sistema de fosfolipasa C (PLC) y activación de la proteína quinasa C (pKC), a través de la inducción de diacilglicerol (DAG), la formación de inositol trifosfato (IP₃), y la consecuente movilización de Ca⁺⁺ (83, 85, 86, 87, 88, 89). De todas maneras, el circuito principal y mejor caracterizado es el de la estimulación por TSH de la adenilato ciclasa de la membrana plasmática. El AMPc producido por la ciclasa es una molécula-señal que por activación de una proteína quinasa dependiente de AMPc, estimula las principales funciones de la glándula, por ejemplo: la captación de yodo (90, 91), iodinación de Tg (57, 92), y la síntesis (93), captación e hidrólisis de Tg (94); también produce un aumento

del metabolismo energético (95) y de la altura del epitelio, una disminución del coloide folicular y una mayor vascularización de la glándula; siendo la hipertrofia e hiperplasia celular el efecto tardío mas estudiado (96). Estos efectos son reproducidos por análogos del AMPc y agentes tales como la forskolina y la toxina colérica que aumentan el contenido del nucleótido (67).

La trascendencia del rol de la vía del AMPc, se evidencia por el hipotiroidismo descrito en pacientes con osteodistrofia hereditaria de Albright y por el hipertiroidismo en los pacientes con el síndrome McCune-Albright (97, 98). En estos casos se identificó una deficiencia congénita o una mutación estimuladora, respectivamente, de la subunidad α de la proteína G que activa la adenilato ciclasa (97, 98).

El receptor de TSH (rTSH) es una glicoproteína localizada en la membrana basal del tirocito (99, 100). Las dificultades experimentales para obtener cantidades suficientes de rTSH puro y la imposibilidad de obtener por ensayos de competencia un anticuerpo monoclonal de calidad para realizar el rastreo en genotecas de expresión (101), hicieron del clonado de esta proteína un desafío recientemente resuelto (78, 102, 103). La estructura del gen que codifica al rTSH humano comprende 60 kb que contienen 10 regiones exónicas (104), y se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 14 (105, 106). La estructura primaria del receptor, deducida de su ADN copia (ADNc) confirma que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (107). Contiene 7 fragmentos con hidropatía y longitud compatibles con segmentos de transmembrana, con abundantes secuencias similares a otros receptores vinculados a proteínas G (108, 109). Sin embargo, a diferencia de otros receptores de esta gran familia, en sus múltiples dominios intracelulares o en el extremo carboxi-terminal posee relativamente pocos sitios de fosforilación de residuos serina o treonina. Estos sitios han sido asociados a la desensibilización del receptor luego de la

exposición a su ligando, lo que explicaría la limitada caída de respuesta observada luego de la estimulación de los tirocitos con TSH (109, 110, 111). Al respecto, se ha descrito que en concentraciones bajas, la TSH ejerce un control positivo sobre el número de receptores, y en dosis mayores produce una leve desensibilización (112, 113, 114). Estudios realizados en cultivos de tirocitos caninos, han demostrado que la acción de agentes que inducen la "desdiferenciación" funcional y el crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los ésteres de forbol (TPA), inhiben parcialmente la acumulación de ARNm del rTSH; efecto reversible por la acción de TSH o forskolina (112, 115).

Como ya se ha mencionado, la captación de yodo es un proceso controlado positivamente por la TSH. En 1960 se determinó la capacidad de la TSH de estimular la concentración de yodo en la tiroides, al observarse que una única inyección de TSH en ratas, induce un aumento del 50 al 100% en la acumulación tiroidea del halógeno, luego de 8 h (116). El efecto máximo fue obtenido a las 24-48 h de la inyección, y se disipó totalmente a las 48 h. En los años '70 se realizaron estudios similares en células aisladas de tiroides bovinas, en las que se observó un efecto estimulador de la TSH y de análogos del AMPc sobre este parámetro luego de 6 h (117, 118); ambos resultados fueron confirmados posteriormente por Weiss y col (119, 120), en la línea celular de tiroides de rata, FRTL-5. Los tiempos relativamente largos vinculados a la inducción del aumento de la captación por TSH, en conjunto con las evidencias que sugieren que esta estimulación es prevenida por el agregado de inhibidores de la síntesis proteica, parecen indicar que esta regulación es el resultado del aumento de la síntesis del transportador mismo, o de un eventual factor activador (117, 118, 119, 120).

La TSH estimula la síntesis proteica en la tiroides, y la expresión tejido específica de diversos genes (121), a través de la modulación de

la transcripción y traducción (122). Ambos efectos son reproducibles por agonistas del AMPc. En particular, existen numerosas evidencias que indican que la síntesis de Tg se encuentra, al menos parcialmente, bajo el control transcripcional de la TSH (35, 93, 123). Van Heuwerswyn y col. (35) han observado que en animales intactos la transcripción del gen de Tg representa el 10% de la actividad total de la ARN polimerasa II. Este parámetro se encuentra significativamente disminuído en núcleos tiroideos de animales hipofisectomizados o con niveles de TSH deprimidos por la administración crónica de hormonas tiroideas. La inyección de TSH exógena en estos animales, restaura rápidamente la actividad transcripcional. Por el contrario, en ratas hiperestimuladas crónicamente con TSH (por administración de agentes inhibidores de la síntesis de hormonas tiroideas) no se observa aumento transcripcional respecto de los valores control. Estos resultados sugieren que en ratas bajo condiciones normales, los niveles basales de TSH determinan la máxima expresión del gen de la Tg (35). En cultivos de células tiroideas de perro y humanas, se ha informado la acción antagónica de la TSH (modulación positiva, AMPc dependiente) y el EGF (modulación negativa), sobre este parámetro (112, 124)

A pesar de los numerosos trabajos realizados, la identidad de los factores con capacidad de unión al ADN involucrados en la regulación AMPc-dependiente de la transcripción del gen de Tg, aún no se encuentra totalmente aclarada. Sin embargo, existe consenso acerca de la ausencia de efectos mediados por CRE o AP1 (125, 126, 127), lo cual sugiere que CREB no participa en el control transcripcional de este gen, mediado por AMPc (128). Por el contrario, los estudios realizados utilizando la técnica de "run-on", han demostrado que la estimulación transcripcional de Tg por AMPc responde a una cinética relativamente lenta (entre 8 y 16 h , en cultivos primarios caninos, dependiendo de las condiciones), e involucra la síntesis de proteína/s (129).

Estos resultados sugieren que el gen de la Tg pertenece al conjunto de genes transcripcionalmente regulados por la vía del AMPc conocidos como de tipo II.

El estudio de la región 5' del gen de Tg de diversas especies demuestra la existencia de regiones altamente conservadas (73%) que se extienden entre -80 y -140 pb, y un bloque altamente repetitivo de homopurina-homopirimidina entre las pb -500 y -300 aproximadamente (34, 490). Asimismo, se han encontrado factores nucleares capaces de interactuar con distintas regiones del promotor del gen de Tg, en particular con secuencias contenidas entre las bases -170 y +1, región necesaria y suficiente para la expresión tejido-específica de genes heterólogos adosados a esta secuencia del promotor (130, 131, 132, 133). Dentro de esta zona, se han identificado tres sitios capaces de interactuar específicamente con el factor tiroideo de transcripción 1 (TTF-1) (132, 134). La integridad de estos sitios sería fundamental para la actividad completa del promotor de rata (132, 134). Asimismo, en esta región se encuentra al menos un sitio de unión para otro factor específico de tejido: el TTF-2, cuya interacción con el promotor determina un aumento significativo de la actividad transcripcional del gen de Tg (132). Se cree que este factor se encuentra relacionado con la modulación hormonal de la expresión de Tg, más que con una señal de "encendido", tal como es considerado el TTF-1 (135). Un tercer elemento, cuyo sitio de unión específica se superpone con el TTF-1, ha sido identificado en el promotor de Tg de rata: el Pax-8 (136, 137), de menor eficiencia en la estimulación de la transcripción (136). Además de estos tres factores transcripcionales específicos, un factor ubicuo, denominado UFA contribuye a la actividad transcripcional de este gen (134). Por otro lado, en el promotor de Tg bovino ha sido demostrada la existencia de un elemento "enhancer" o aumentador de la transcripción, corriente arriba de esta región del promotor (138), en el que se encuentran tres regiones de unión para TTF-1. A pesar de estos resultados, aún

existen controversias acerca del mecanismo de regulación transcripcional de este gen, si bien se asume que el TTF-1 no estaría involucrado en la regulación mediada por AMPc (138). A pesar de que el TTF-2 es el mejor candidato para este tipo de modulación, se ha sugerido la participación de factores alternativos aún no identificados (132, 138) (Figura 7).

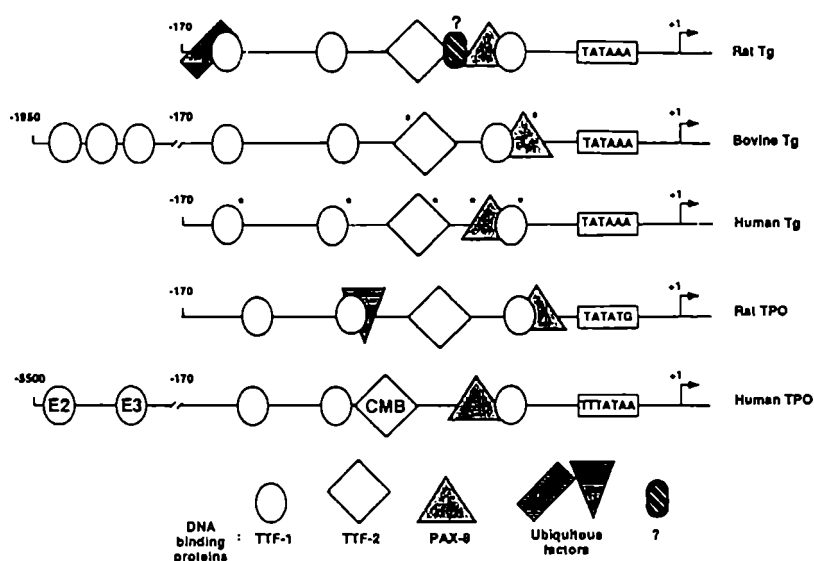


Figura 7. Estructura del gen de Tg y TPO. Los símbolos indican sitios de unión mapeados por "DNAsa footprinting", y los asteriscos se refieren a los sitios inferidos por homología de secuencia. Los números indican la distancia del sitio de inicio de la transcripción (+1) de Tg y TPO.

De acuerdo a numerosas evidencias experimentales, la TSH aumenta la actividad enzimática de TPO (123) y los niveles de ARNm de esta proteína, en tirocitos de todas las especies estudiadas (139, 140). Este efecto también es reproducido por análogos del AMPc y por forskolina. A pesar de que Damante y col (140), y Foti y col (141), utilizando células FRTL-5 no detectaron originalmente el efecto estimulador de la TSH sobre la actividad organificadora de yodo, resultados más recientes avalan la existencia de este mecanismo de

regulación en el modelo de células tiroideas de rata (142, 58, 143). Hasta el año 1992, aún existían dudas acerca del control transcripcional por TSH de la TPO, y se suponía que involucraba exclusivamente mecanismos post-transcripcionales. Sin embargo el control de la expresión del gen de TPO por TSH actualmente se encuentra fuera de toda duda (144).

En contraste con la modulación del gen de la Tg, la TSH, a través del AMPc, induce un rápido aumento transcripcional del gen de la TPO, que no requiere la síntesis proteica (129). Por consiguiente, la TPO se ha clasificado junto a genes regulables por AMPc de tipo I, si bien en este caso tampoco se hallan presentes las secuencias características de este tipo de genes (145). La expresión del gen de TPO presenta algunas diferencias con el de Tg. La primera corresponde a los niveles de ARNm, los cuales son significativamente menores que los de Tg (146). Segundo, el contenido de ARNm de TPO es mucho más sensible a la acción moduladora de la TSH. Por último, al menos en el modelo constituido por las células FRTL-5, en la regulación del contenido de ARNm de TPO participan eventos post-transcripcionales (140). Los promotores de estos dos genes también presentan diferencias remarcables. Si bien ambos poseen una "TATA box", posicionada 20 a 30 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, estos elementos poseen diferencias funcionales significativas (147) que podrían ser las responsables, al menos en parte, de las distintas respuestas al estímulo de la TSH (148). Asimismo, en la modulación de la transcripción del gen de la TPO participa otro factor ubícuo (UFB), diferente del que se describió para el gen de Tg (147); además del TTF-1, TTF-2 y el Pax-8 (146). Respecto de este último factor, la dependencia de los niveles de Pax-8 en la actividad del promotor de TPO es significativamente mayor que para Tg (136) (Figura 7).

El efecto de la TSH sobre la proliferación de las células foliculares ha sido extensivamente estudiado (68, 149, 67, 150). Además de las evidencias endocrinológicas clásicas, los resultados de los estudios fisiológicos reafirman este concepto. Por ejemplo: en ratas jóvenes, el índice mitótico aumenta 5 veces por efecto del tratamiento con TSH (151) y correlaciona con el aumento circadiano de la TSH circulante (152). Por otro lado, la TSH aumenta el crecimiento de explantes de tiroides humanas transplantadas en ratones "nude" (153) y aumenta la proliferación celular de diversas especies animales, incluido el humano (154). El mecanismo implicado en esta modulación de la TSH involucra al sistema adenilato ciclasa-AMPc (115, 155, 156). Sin embargo, se ha postulado que, en células humanas, la activación de sistema Ca^{++} -PIP₂, podría cumplir un papel complementario (101).

Ciertas evidencias obtenidas en ensayos *in vivo*, indican que la estimulación del crecimiento tiroideo ejercido por la TSH es parcialmente dependiente de otras hormonas. Los efectos tróficos de la TSH se encuentran disminuídos en animales hipofisectomizados (154) o adrenalectomizados (157). Por otro lado, en los sistemas *in vitro*, los efectos de la TSH sobre el crecimiento, requieren de insulina o del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) (158, 159, 160, 161).

2.2. El Iodo

Desde que E. Bauman, en 1896, describiera por primera vez la presencia de un compuesto iodado en extractos de tiroides humanas, se recorrió un largo camino en el estudio del rol metabólico que desempeña este halógeno en el funcionamiento tiroideo. Si bien ya en el año 1820 se conocía el efecto beneficioso del iodo en el tratamiento del bocio, no se describió un efecto independiente del eje hipotálamo-hipofisario sino hasta 1941, cuando Chapman (162) informó que en

animales hipofisectomizados, la ingesta pobre en yodo produce hipertrofia e hiperplasia de este tejido. Desde entonces, numerosos trabajos realizados *in vivo* e *in vitro* han aportado evidencias en este sentido (163, 164, 165, 166).

Las respuestas metabólicas de la tiroides frente a las variaciones del yodo disponible, se manifiestan tanto en presencia de niveles constantes, como en ausencia total de TSH, por lo que se han denominado global-

Tabla 1: Acción del yodo sobre el metabolismo tiroideo

Condiciones	Exceso de yodo		Defecto de yodo	
Parámetro	Efecto	Ref	Efecto	Ref
Transporte de yodo	↓	167-170		
Organificación de yodo	↓	171-1174		
Secreción hormonal	↓	175- 181		
Formación de gotas de coloide	↓	182-184		
Proteasa ácida	↓	185-187		
Formación de AMPc	↓	188-190	↑	199-201
Consumo de O ₂	↓	191, 192		
"Binding" de TSH	=	193		
Oxidación de glucosa	↓/↑	194-196		
Producción de bocio	↓	197, 198	↑	202-205

mente: "autorregulación tiroidea". En la literatura abundan las evidencias que sugieren que los niveles intracelulares del halógeno controlan en parte el crecimiento glandular, así como la mayoría de los pasos involucrados en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas (166). Los estudios realizados en condiciones de exceso y de déficit de yodo, sugieren que estas situaciones experimentales reflejan un comportamiento fundamentalmente paralelo y de signo opuesto, aunque existen excepciones (Tabla 1). A continuación se hará mención a algunos de estos efectos del yodo.

De acuerdo a las evidencias previamente mencionadas, la captación de iodo se encuentra modulada fundamentalmente por la TSH. Sin embargo, el iodo mismo constituye otro importante regulador de esta trascendente función diferenciada. Los primeros estudios al respecto fueron realizados por Halmi y Stuelke (163), quienes demostraron que la administración de iodo a ratas hipofisectomizadas disminuye la relación $[I^-]$ en el tejido / $[I^-]$ sérico, de manera sensible a la presencia de PTU y MMI. Halmi (206) definió a este efecto como "autorregulación tiroidea", ya que este tipo de inhibición en la acumulación de iodo resulta independiente de la presencia de TSH. Estos resultados fueron confirmados posteriormente en células tiroideas dispersadas, ya que en este último modelo experimental la preincubación con iodo induce una disminución del 50% en la acumulación del halógeno (207). De acuerdo a los resultados obtenidos por Sherwin y Tong (207), la modulación autorregulatoria observada afecta únicamente el influjo del halógeno y resulta sensible a la presencia de MMI, en concordancia con las evidencias obtenidas en los estudios realizados *in vivo*. Los mismos autores señalan que la inhibición de la captación inducida por iodo provoca un aumento en la constante de afinidad del transportador (K_m) sin alterar la velocidad máxima (V_m). Considerando que la TSH aumenta únicamente la V_m , se ha propuesto un complejo mecanismo dual a través del cual es regulada la acumulación de iodo en la tiroides, de manera que la TSH estimula y el yoduro inhibe este parámetro mediante diferentes mecanismos. En 1986 el efecto del iodo sobre su propia acumulación fue caracterizado en las células FRTL-5, confirmándose los resultados obtenidos *in vivo* y en células dispersadas (208).

Los efectos del iodo sobre la reacción de organificación y el acoplamiento de iodotironinas, son complejos y dependientes de la magnitud y duración del cambio en la concentración de iodo disponible. Wolff y Chaikoff

(174) observaron que, cuando la concentración de iodo circulante alcanza un nivel crítico, en condiciones agudas existe un punto de inflexión en el incremento de la organificación, y el contenido de iodo orgánico decrece rápida y progresivamente en función del nivel del halógeno ofertado (Figura 8.a). Este efecto fue originalmente descrito en cortes de tiroides de oveja (173), como una reversión aguda de la dependencia lineal de la formación de iodo orgánico, frente al aumento del iodo externo, y fue posteriormente confirmado por experimentos realizados en ratas *in vivo*. A pesar de que se han elaborado distintas hipótesis, el mecanismo del efecto Wolff Chaikoff no ha sido aún totalmente elucidado (209, 210, 211, 212).

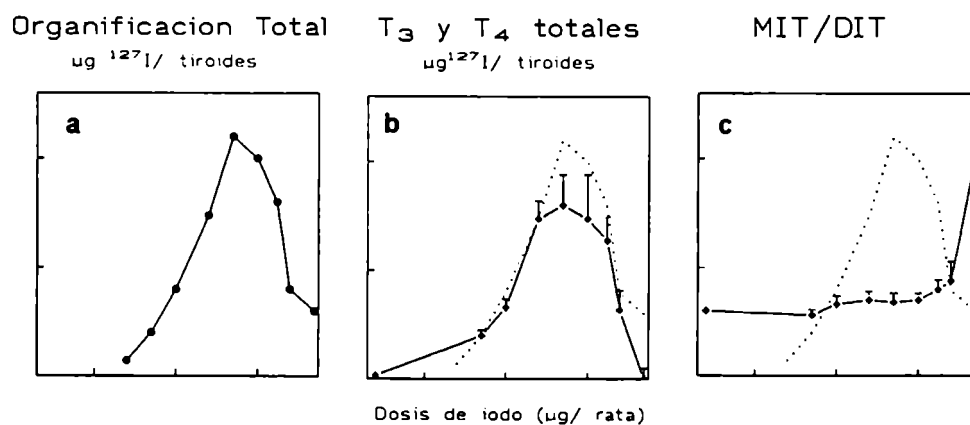


Figura 8. Efecto de dosis crecientes de iodo, administrado 4 h antes del sacrificio, en el metabolismo tiroideo de iodo en ratas. La línea punteada corresponde al total de iodo organificado.

El bloqueo de la organificación provocado por iodo es temporal, y la reacción alcanza los niveles normales a pesar de mantenerse la oferta elevada de iodo circulante, ya sea por administración de una sola dosis de iodo en animales nefrectomizados, o por la inyección periódica del halógeno (efecto conocido como "adaptación" o "escape") (174, 203). Este fenómeno podría ser una de las causas de que la administración continua de un exceso de iodo

no siempre induce bocio. Braverman e Ingbar (214), no pudieron reproducir el efecto Wolff-Chaikoff en tiroides de ratas sometidas a una dieta rica en iodo. Dado que en estos animales el transporte del halógeno se encuentra disminuido, los autores sugirieron que el fenómeno de "escape" podría ser consecuencia de la inhibición en la captación de iodo, lo cual permitiría que la glándula restableciera los niveles intracelulares de iodo. El efecto Wolff-Chaikoff puede ser forzado: Nagataki y col (215) demostraron que cuando ocurre el fenómeno de adaptación, una nueva administración de altas dosis de iodo puede reinducir, por difusión simple a través de la membrana plasmática del tirocito, el bloqueo de la organificación.

De acuerdo a los resultados de Nagataki e Ingbar (216) representados en la Figura 8.b, la tiroides no sería capaz de prevenir un aumento agudo de la síntesis de hormonas tiroideas en respuesta a un aumento moderado del iodo, si bien el efecto Wolff- Chaikoff garantizaría una disminución gradual en el nivel absoluto de iodinación, cuando la concentración de iodo alcanza un nivel crítico, con la consecuente inhibición de la síntesis hormonal. Por otro lado, en el rango creciente de dosis de iodo bajo las cuales la organificación se encuentra inhibida, se hallaron cambios cualitativos en la naturaleza del iodo orgánico intraglandular. La proporción del iodo recientemente captado que se incorpora a hormonas tiroideas disminuye progresivamente, mientras que aumenta la proporción de MIT respecto de DIT (171, 174, 216) (Figura 8.c).

La utilización terapéutica del iodo para el tratamiento de pacientes con tirotoxicosis data del año 1923, si bien no se conocía entonces el mecanismo de acción involucrado. Los trabajos de Greer y De Groot (491), sugieren que el IK deprime la liberación de ^{131}I en tiroides humanas. Estos resultados fueron confirmados por otros autores, quienes describieron además la acción

inhibitoria del halógeno sobre este mismo parámetro estimulado por TSH (217). Este efecto autorregulatorio ha sido estudiado en pacientes con la enfermedad de Graves (218), nódulos autonómicos tiroideos (181), y bocios multinodulares tóxicos (219). Asimismo, en humanos eutiroideos se ha demostrado que la administración crónica de iodo durante 1 mes, deprime los niveles de iodotiroquinas séricas, las cuales retornan a los niveles normales a partir de un aumento sostenido de la TSH circulante (326). Por otro lado, los estudios realizados en distintos modelos experimentales avalan ampliamente la hipótesis de que el tratamiento con iodo disminuye las hormonas tiroideas circulantes, a través de un efecto directo sobre la tiroides (177, 178) y mediado por la inhibición de la liberación de T_3 y T_4 (176, 178, 179, 220). Estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, señalan a la formación de gotas de coloide y la proteólisis de Tg como los pasos vinculados al proceso de liberación de hormonas tiroideas sensibles al efecto inhibitorio del iodo, aún bajo la modulación positiva de la TSH (175, 182, 183, 184, 186, 187, 221).

Respecto del sistema de segundos mensajeros intracelulares que se encuentra afectado por los cambios de iodo intracelular, numerosos trabajos indican que el exceso de iodo inhibe la vía constituida por la adenilato ciclasa-AMPC estimulada por TSH, de manera sensible a la presencia de drogas antitiroideas (MMI, PTU) (222, 223, 224). Por otro lado, cuando la disponibilidad del halógeno se encuentra disminuida, en ratas sometidas a una dieta pobre en iodo, se ha observado una respuesta significativamente mayor en la acumulación de AMPC bajo el estímulo de la TSH (113-115).

El mecanismo involucrado en la inhibición por iodo de la cascada del AMPC, probablemente se encuentre relacionado con la formación del nucleótido cíclico, ya que no se ha detectado ningun efecto del halógeno sobre la degradación del AMPC (225) y no se han hallado cambios cualitativos en

la actividad de la fosfodiesterasa (175, 188, 199-201, 222, 225). Al respecto, Pochet y col (188) han postulado que el iodo altera las características funcionales de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa, en concordancia con lo informado por otros autores (189). Si bien se ha propuesto que el efecto autorregulatorio más importante es la modulación de la acumulación de este nucleótido cíclico, la inhibición por altas concentraciones de iodo de esta vía de segundos mensajeros no alcanza a explicar la totalidad de sus efectos sobre la tiroides. De acuerdo con los resultados de Laurent y col (226), concentraciones elevadas de iodo también inhiben la acumulación de fosfoinosítidos estimulada por carbamilcolina de manera independiente del sistema del AMPc, a través de un mecanismo relacionado con la organificación del halógeno.

Diversos autores han propuesto que la acción del iodo sobre la tiroides podría explicarse en términos de un efecto generalizado sobre el metabolismo intermedio. Anderson y Evans (227) han sugerido que el exceso de iodo disminuye o bloquea el consumo de oxígeno estimulado por TSH, resultados confirmados por numerosos autores (228, 191, 192). En cortes de tiroides humanas y ovinas se ha observado que el iodo (10^{-3} - 10^{-4} M) estimula la oxidación de ^{14}C -1-glucosa y, en menor proporción, la oxidación de ^{14}C -6-glucosa (194). Estos investigadores han propuesto que el efecto estimulador del iodo es una consecuencia del aumento en la oxidación de las coenzimas reducidas, producto de la oxidación y subsecuente reducción del halógeno. Green (195) observó también, que una dosis de 10^{-4} M de iodo aumenta el consumo de oxígeno y la oxidación de glucosa, aunque concentraciones mayores disminuyen este parámetro así como la oxidación de piruvato y acetato. Por otro lado, Burke (196) demostró que el IK bloquea la estimulación por TSH de la oxidación de ^{14}C -1-glucosa y la incorporación de ^{32}P en fosfolípidos.

Las acciones del iodo sobre el crecimiento tiroideo ha sido uno de los efectos más estudiados. Como ya se ha mencionado, los estudios de Chapman (162) realizados en ratas hipofisectomizadas, sometidas a una dieta pobre en iodo, indican que el peso y la altura del epitelio tiroideo aumentan significativamente, respecto de los animales control. De acuerdo con estos resultados, Bray (202) ha descripto que el crecimiento glandular estimulado por TSH es mayor en ratas sometidas a una dieta pobre en iodo. El bocio también puede desarrollarse con niveles normales de TSH: Naeije y col. (203) observaron que en ratas bajo una ingesta pobre en el halógeno, el peso tiroideo aumenta aún en presencia de niveles normales de TSH, mientras que el contenido de iodo intratiroideo se encuentra significativamente disminuído respecto de los valores control. Resultados similares fueron publicados por Matsuzaki y col. (204) en animales tratados con MTU, en los cuales los bocios desarrollados con niveles de TSH normales, cursan con una significativa disminución en el contenido de iodo orgánico intraglandular. Por otro lado, el PTU potencia el crecimiento inducido por TSH (167, 205), avalando la hipótesis de la existencia de algún compuesto intratiroideo de iodo organificado capaz de aumentar la sensibilidad a la acción de la TSH. Estos efectos son evidentes aún en el rango de concentraciones fisiológicas de iodo (229).

Cuando se realizan tratamientos con exceso de iodo, se manifiesta la situación inversa a la descripta en el párrafo anterior. Es bien conocido que el tratamiento con Lugol disminuye el tamaño del bocio. Por otro lado, el IK inhibe la acción bociogénica de la TSH en ratas hipofisectomizadas (197). Pisarev e Itoiz (198) demostraron que dosis crecientes de IK disminuyen la acción de la TSH, el AMPc y del GMPc sobre el crecimiento y la síntesis proteica tiroidea.

Las acciones modulatorias del yodo que se han descripto, son de gran valor homeostático y se encuentran indudablemente vinculadas al rol crítico que desempeña el yodo como sustrato de la síntesis de las hormonas tiroideas. Se podría decir al respecto que en las condiciones de defecto de yodo las variaciones funcionales se relacionan fundamentalmente con un mejor aprovechamiento del halógeno disponible, como sustrato para la síntesis hormonal. En el otro extremo, la adecuación homeostática frente al exceso de yodo ocurre a diferentes niveles en la tiroides, así como a través de la TSH. Una vez que la TSH disminuye como consecuencia del aumento agudo de los niveles de hormonas tiroideas en sangre (Figura 8.b), se tornarían evidentes los mecanismos autorregulatorios frente al exceso de yodo.

2.3. Inervación Simpática Tiroidea

Los axones provenientes del ganglio cervical superior (GCS) proveen inervación simpática a estructuras del cráneo, cuello y cara, incluyendo órganos endócrinos como la pineal, la hipófisis, la eminencia media, la paratiroides y la tiroides. Las neuronas cuyos cuerpos se localizan en el ganglio cervical inferior o medio, envían sus axones a través del GCS y del nervio carotídeo externo (230, 231) (Figura 4). La presencia de nervios simpáticos en la tiroides fue demostrada varias décadas atrás. Si bien originalmente se supuso que sólo hacían contacto con los vasos sanguíneos (14, 232), la administración de norepinefrina marcada con tritio a ratones normales cuyas glándulas tiroideas fueron posteriormente analizadas por autorradiografía y microscopía electrónica reveló que los terminales simpáticos intraglandulares se encuentran en estrecho contacto con las células foliculares, además de capilares y paredes arteriolas. Esta evidencia morfológica sugiere que las células foliculares constituyen el sustrato anatómico de una influencia directa, "no-vascular" simpática, además del efecto catecolami-

nérgico sobre la función tiroidea a través de la microcirculación en la glándula (138, 233).

Poco tiempo después de que Graves y von Basedow describieran por primera vez el hipertiroidismo se sugirió que la enfermedad podría ser causada por una hiperactividad de los nervios simpáticos cervicales (234). El descubrimiento de la adrenalina fue rápidamente seguido de la observación de que esta catecolamina podía producir muchos de los fenómenos asociados al hipertiroidismo (234). El hallazgo de cambios patológicos en las estructuras cervicales simpáticas de pacientes con hipertiroidismo condujo a la utilización de la simpatectomía cervical como terapia para la enfermedad (234). Esta aproximación terapéutica fue rápidamente abandonada aunque fármacos de uso actual incluyen drogas antiadrenérgicas tanto en la preparación de los pacientes hipertiroideos para tiroidectomía, como en el manejo de las crisis tirotóxicas (234-237). Sin embargo, estos tratamientos se basan en la hipótesis de que las drogas antiadrenérgicas interfieren con el efecto de las hormonas tiroideas más que sobre su síntesis y secreción. Además, parece estar hoy bien establecido que mecanismos genético-inmunológicos juegan un papel importante en el desarrollo del hipertiroidismo. A pesar de estas consideraciones, como se discutirá a continuación, dado que el sistema nervioso simpático parece participar en la regulación fisiológica de la función tiroidea, no puede descartarse que la actividad simpática participe en el desenlace del hipertiroidismo, en tanto que mecanismos inmunológicos podrían perpetuar la enfermedad. Por lo tanto, el estudio de la influencia del SNS sobre la función tiroidea es de interés no solamente desde una perspectiva teórica sino también desde un punto de vista clínico.

Las estrategias experimentales empleadas para el estudio *in vivo* de la consecuencia neuroendocrinológica de la inervación simpática, han sido fundamentalmente las siguientes:

- a) el estudio de la activación simpática en condiciones similares a las fisiológicas, examinando el efecto de la estimulación eléctrica del nervio simpático, o bien de la activación transiente postsináptica que se produce en condiciones agudas de GCSx, conocida como "degeneración Walleriana" o reacción de degeneración anterógrada. En este último caso, ha sido determinado el tiempo de la degeneración Walleriana, midiendo los niveles del neurotransmisor en el tejido desnervado. La depleción de norepinefrina (NE) del terminal nervioso remanente que permanece en contacto con la glándula tiroidea comienza entre las 8 y 12 h, aproximadamente, y se completa a las 24-48 h (238). Durante este período es posible detectar activación postsináptica.
- b) experimentos que denominaremos de "deprivación", en los cuales se estudia el efecto crónico (de 1- 4 semanas posteriores) de la gangliectomía cervical superior (GCSx).

Con la utilización de las estrategias mencionadas para el estudio *in vivo*, y los estudios llevados a cabo en distintos modelos experimentales *in vitro*, se han reunido una serie de evidencias acerca de la participación simpática en la regulación de la función tiroidea. La mayoría de los estudios realizados sobre la acción de las catecolaminas, se ha centrado en los efectos farmacológicos de la norepinefrina sobre la liberación de las hormonas tiroideas. Mediante esta metodología se elaboró la hipótesis según la cual, en presencia de bajas concentraciones de TSH circulante, incluso en su ausencia, las catecolaminas incrementan la liberación de hormonas tiroideas, en tanto que en presencia de niveles de TSH normal o aumentados, el efecto es fundamen-

talmente inhibitorio (230). En este sentido, se ha demostrado que en ratones con niveles de TSH disminuídos, la administración de NE o de drogas que provocan la liberación de catecolaminas, induce secreción de hormonas tiroideas, evaluada mediante diversas aproximaciones experimentales (por ejemplo, por la cuantificación de la endocitosis de Tg, la migración de lisosomas hacia la Tg endocitada o la liberación de hormonas tiroideas marcadas, hacia el torrente sanguíneo) (239, 240, 241). Esta hipótesis debe considerarse en forma crítica, teniendo en cuenta que se apoya en experimentos realizados en condiciones de estimulación farmacológica. Sin embargo, la actividad estimulatoria de la NE de origen neural sobre la liberación de T₄ bajo condiciones de TSH muy disminuída por administración de T₄, fue confirmada en ratones bajo estimulación eléctrica del GCS (242). En otra serie de experimentos realizados en ratas con GCSx bilateral y sacrificadas durante el período de degeneración Walleriana, se detectó una inhibición significativa de los niveles plasmáticos de T₄, TSH, y de la captación tiroidea de ¹³¹I (238). Estos resultados fueron explicados en términos de una inhibición a nivel central y periférico por efecto del neurotransmisor liberado, ya que en estas condiciones la TSH exógena no es capaz de inducir un aumento en los niveles plasmáticos de T₄ (238). El efecto de la GCSx a nivel central se encuentra avalado por la demostración neuroquímica y morfológica de las proyecciones cervicales a la eminencia media (243).

En otra serie de estudios, la administración de análogos de glucosa (2-deoxi-glucosa) con el objeto de inducir una estimulación central y periférica de la actividad simpática en ratones, provocó una inhibición de la capacidad de respuesta a la TSH en la secreción de hormonas tiroideas (244). Los resultados mencionados avalan la hipótesis acerca de un efecto de la innervación simpática a nivel tiroideo, altamente dependiente de la disponibilidad de TSH.

La influencia de la NE sobre los niveles de nucleótidos cíclicos en la tiroides, puede constituir una fuente de información acerca del mecanismo involucrado en la acción adrenérgica a nivel tiroideo. Inicialmente se demostró que la NE en condiciones agudas, bloquea la acumulación de AMPc inducida por TSH (245, 246), avalando la hipótesis acerca del efecto noradrenérgico inhibitorio sobre el estímulo en la liberación hormonal tiroidea inducida por tirotrófina. Cuando el estímulo utilizado fue prostaglandina E₂, la NE no fue capaz de revertir la acumulación del nucleótido cíclico en la glándula, indicando la existencia de un efecto específico de la NE sobre la TSH (247). Por otra parte, se ha descrito una acción estimuladora de la NE sobre la acumulación de GMPc en la tiroides (247, 248). Basándose en evidencias sobre algunas acciones antagónicas de los segundos mensajeros AMPc y GMPc, se ha sugerido que la NE inhibe la secreción de hormonas tiroideas inducida por TSH a través de la alteración de la relación AMPc/GMPc en el tirocito (249).

Existen pocos estudios acerca de los posibles subtipos de α -adrenoreceptores involucrados en los efectos de la NE, si bien la mayoría de las evidencias parecen indicar que los receptores del tipo α_2 se encontrarían vinculados a la inhibición de la acumulación de AMPc en el tejido tiroideo humano (247), de cerdo (250), y de perro (251), aunque en otros modelos experimentales (como en gato o vaca) se postulan mecanismos alternativos (250). En una serie de estudios realizados en ratones, la inhibición noradrenérgica en la liberación hormonal estimulada por TSH fue bloqueada por antagonistas de receptores del tipo α_1 y α_2 (239), mientras que utilizando un sistema *in vitro* de tejido tiroideo de la misma especie, se observó que la liberación de T₄ estimulada por TSH es un proceso mediado por receptores del tipo α_1 (252). La administración sistémica de bloqueantes α -adrenérgicos antagoniza la disminución de los niveles séricos de T₄ hallados durante la reacción de degeneración

anterógrada en ratas (238) o luego de la inyección de 2-deoxiglucosa en ratones (253). Una mediación α -adrenérgica similar para la acción inhibitoria noradrenérgica fue hallada en experimentos realizados *in vitro*, indicando que el aumento en la liberación simpática producto del proceso degenerativo no solamente decrece el flujo sanguíneo local (238), sino que ejerce su acción moduladora directamente sobre el acino tiroideo (253). Los resultados mencionados sugieren que la misma acción de la NE podría estar mediada por diferentes subtipos de receptores dependiendo de la especie y el modelo experimental, aunque en general existe consenso acerca de los efectos inhibitorios de la NE sobre la liberación de hormonas tiroideas que estarían mediados por un mecanismo dependiente de receptores de tipo α . Se ha descrito también la presencia de receptores del tipo β -adrenérgico en el tejido tiroideo normal, habiéndose determinado en ratones, que la activación de β -receptores induce un aumento en la secreción hormonal (254, 255).

El conjunto de los resultados de estos y otros estudios sugieren que:

- 1- la NE de origen neural actúa sobre receptores del tipo α y β -adrenérgicos, presentes en los tirocitos, provocando inhibición de la liberación de T_4 , en el caso de los receptores α_1 o α_2 , y estimulación de este parámetro en el segundo,
- 2- en adición a la NE, otros neurotransmisor/es inhibitorio/s son liberados de las terminales nerviosas, como lo indica la persistencia de niveles deprimidos de T_4 luego de la administración combinada de bloqueantes de receptores α y β -adrenérgicos (238). Como ha sido mencionado previamente, algunos neuropéptidos (como el neuropéptido Y) se encuentran presentes en los nervios tiroideos y podrían ser candidatos en este sentido (230).

Los estudios realizados en ratas simpatectomizadas crónicamente han provisto de evidencias adicionales sobre el rol de la innervación simpática cervical en la regulación tiroidea. Una ventaja considerable de esta estrategia experimental se apoya en la evidencia de que la innervación procedente de cada uno de los ganglios cervicales presenta una distribución ipsilateral, de manera que puede utilizarse el modelo de remoción ganglionar unilateral. Esto permite el uso de datos apareados lo que minimiza la variación interna de los valores experimentales evaluados. La evidencia de que la GCSx produce una desnervación significativa del lóbulo tiroideo ipsilateral, queda demostrada por una caída del 80% en el contenido de NE de ese lóbulo pasados 12 días de la operación. Luego de este período se observa también un incremento ponderal del lóbulo ipsilateral, así como un incremento de la respuesta bociogénica inducida por MMI o TSH (238). Asimismo, el contenido de T_3 y T_4 expresado por mg de tejido fue significativamente menor que del lóbulo tiroideo desnervado, lo que podría deberse a una alteración en el metabolismo de DIT a T_3 y T_4 . En ratas estudiadas luego de 2 a 4 semanas de la GCSx, se observó también una respuesta bociogénica aumentada en respuesta a la TSH endógena o exógena, o a MMI (238). La GCSx crónica induce además un incremento en la concentración de receptores α -adrenérgicos tiroideos, una disminución en la captación de ^{86}Rb (indicador del flujo sanguíneo glandular), y luego de 4 semanas de la operación se observó la aparición de bocio espontáneo. La disminución del flujo sanguíneo glandular (cuantificada por la técnica del ^{86}Rb) descartó la posibilidad de que el aumento de tamaño tiroideo inducido por la GCSx pueda deberse a una vasodilatación local (256). Además, dado que los efectos de la GCSx crónica no se ven acompañados de modificaciones significativas en los niveles séricos de TSH, se concluyó que la remoción del GCS aumenta la sensibilidad trófica de la glándula a la tirotrófina circulante.

Resulta evidente que la interacción neuroendócrina a nivel de la función tiroidea tiene trascendencia no sólo desde un punto de vista de investigación básica, sino también reviste una potencial aplicación en la terapéutica. En pacientes con enfermedades denominadas "no-tiroideas" se ha observado una disminución en los niveles séricos de TSH, T_3 y T_4 . Si bien el mecanismo involucrado en estas alteraciones no ha sido completamente aclarado, mediante la administración sistémica de aceite de trementina en ratas es posible inducir una depresión de la función del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo. Trabajando sobre este modelo experimental de enfermedad "tiroidea-no tiroidea", se observó que la sección previa del nervio carotídeo externo provoca una reversión en los niveles deprimidos de T_4 . Se ha postulado por lo tanto, que la proyección simpática a la tiroides podría participar en la disminución de T_4 en el cuadro patológico descrito (257).

2.4. Otros moduladores

Como se ha mencionado previamente, la glándula tiroides recibe el aporte de las neuronas parasimpáticas localizadas en ganglios tiroideos locales, cuyo aporte preganglionar deriva del núcleo motor dorsal del vago y alcanza la tiroides a través de los nervios vago, laríngeo y tiroideo (Figura 4) (258). Las fibras colinérgicas penetran en la tiroides e inervan las células foliculares y los vasos sanguíneos, de manera que resulta altamente probable la existencia del control colinérgico fisiológico sobre la función tiroidea (259). Estudios realizados en perros (260) y ratones (16), indican que la administración de agonistas colinérgicos disminuyen la liberación de hormonas tiroideas, en presencia de niveles normales o aumentados de TSH. Por otro lado, los resultados de Romeo y col (261), obtenidos en ratas sometidas a la descentralización parasimpática, sugieren que la respuesta bociogénica y el aumento del índice mitótico del lóbulo

tiroideo remanente, se encuentran disminuídos como consecuencia de la hemitiroidectomía, en respuesta a la ausencia de estímulo parasimpático. Sin embargo, aún no existe consenso acerca de una acción colinérgica parasimpática directa sobre el tirocito, o si se trata de una acción vasomotora local. Al respecto ha sido descrito un efecto vasodilatador como resultado del estímulo vagal (262).

En los últimos años se ha demostrado la presencia de distintos neuropéptidos en la tiroides, y la existencia de neuronas peptidérgicas intratiroides se encuentra bien establecida. El primer neuropéptido descrito en este tejido fue el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (18), que parece ser el de mayor transcendencia en cuanto a los efectos moduladores en este tejido. Han sido descritos nervios inmunoreactivos para VIP alrededor de los vasos sanguíneos y en la proximidad de los folículos tiroideos, con una abundancia interespecie muy variable (18). En estudios realizados en ratones se ha descrito un efecto estimulador de este péptido en la secreción hormonal tiroidea en condiciones basales, o como potenciador de la respuesta a TSH en el mismo parámetro (18). En estudios realizados *in vitro*, se ha determinado que el VIP estimula la producción de AMPc en tiroides de ratón (18) y humanas (263), así como la producción de gotas de coloide (18, 264). Sin embargo, la activación de la liberación hormonal por VIP parece encontrarse mediada por otro sistema de segundos mensajeros (266). Al respecto, estudios realizados en tiroides de ratón y humanas sugieren que la estimulación con TSH o VIP de la liberación hormonal y de la acumulación de AMPc poseen diferentes cinéticas y eficacias (18). Por otro lado, el bloqueo de los α -adrenoreceptores inhibe la secreción hormonal estimulada por TSH, pero no la inducida por VIP (265).

Otros sistemas hormonales participan también en la regulación de la función y el crecimiento tiroideo. Resulta de particular interés la

acción de las propias hormonas tiroideas en el control de la proliferación celular. En este sentido, ha sido demostrada la acción estimuladora sobre este parámetro de la tiroxina en tumores tiroideos humanos transplantados en ratas *in vivo* (267), y sobre células tiroideas en cultivo con altos niveles de expresión de receptores para T_3 (268).

La hormona de crecimiento, probablemente a través del factor de crecimiento de tipo insulina (IGF-I) induce un aumento en el crecimiento tiroideo, sin afectar en el mismo sentido la función diferenciada glandular, de acuerdo al estudio de los bocios de pacientes con acromegalia (269, 270, 271), a pesar de haberse informado cierto grado de autonomía en estos crecimientos patológicos (272). Por otro lado, la gonadotrofina coriónica humana activa la vía de segundos mensajeros vinculada a la adenilato ciclasa-AMPC y la proliferación celular en células FRTL-5 y de tiroides humanas (273, 274), en el orden de concentraciones normales durante el embarazo (274, 275).

Las células foliculares, al igual que otros sistemas celulares, responden *in vitro* a una gran variedad de factores parácrinos, algunos de los cuales son sintetizados y secretados por los mismos tirocitos (secreción autócrina). Sobre estas células, se ha demostrado la acción mitogénica o comitogénica (permisiva) de muchos factores de crecimiento: el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (FGF), IGF-I, IGF-II e insulina, incluso en el rango de concentraciones fisiológicas (124, 160, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285). El IGF-I es producido por células tiroideas de oveja, el IGF-2 por las células FRTL-5 (281) y el FGF por tirocitos porcinos (276). Por el contrario, de acuerdo a lo descrito en otras células epiteliales, al menos una hormona local ha sido indentificada como inhibidora de la proliferación celular tiroidea: el factor de crecimiento tumoral TGF- β (286, 287, 288).

LA GLANDULA TIROIDES EN CONDICIONES PATOLOGICAS

Existen numerosas patologías asociadas al tejido tiroideo, aunque el conocimiento acerca de las alteraciones bioquímicas desencadenantes de las mismas es aún fragmentario.

Se denomina hipertiroidismo o tirotoxicosis al hiperfuncionamiento tiroideo, cuya elevada producción de hormonas puede deberse a múltiples trastornos de la glándula, incluyendo en raras ocasiones, a los tumores benignos y malignos (289). Se presenta fundamentalmente en dos cuadros clínicos: La enfermedad de Graves-Basedow (290, 291), autoinmunopatía que se caracteriza por la producción de inmunoglobulinas circulantes (TSI) capaces de unirse al receptor de TSH, produciendo una estimulación crónica de la función glandular, que induce la hipersecreción de hormonas tiroideas (llamado síndrome hipertiroides). En este cuadro la tiroides presenta un crecimiento difuso e hiperplasia (bocio difuso tirotóxico) y se asocia, frecuentemente, con una protrusión de los globos oculares (exoftalmos). La secreción de TSH hipofisaria se encuentra deprimida debido a los elevados niveles de hormonas tiroideas séricas (292). El segundo cuadro asociado al hipertiroidismo es conocido como la enfermedad de Plummer (293, 294) o adenoma tóxico, que se caracteriza por un bocio nodular único, con frecuente ausencia de signos oculares. Son adenomas hiperfuncionantes que adquieren autonomía del control hipofisario, y cuya presencia se detecta mediante centelleografía.

El hipotiroidismo es una condición caracterizada por la producción insuficiente de iodotironinas tiroideas bajo estímulos normales de la unidad hipotálamo-hipofisaria (hipotiroidismo primario) (295), o bien por disminución de dicho estímulo (hipotiroidismo central) (296). El déficit de hormonas

tiroideas circulantes, ya sea por desórdenes hipofisarios, deficiencia de iodo, anomalías congénitas del metabolismo hormonal, o agentes bociogénicos, produce una hipersecreción de TSH (siempre que la adenohipófisis no se encuentre comprometida). Los niveles elevados de tirotrófina inducen, secuencialmente y dependiendo de la persistencia de la hiperestimulación, una hiperplasia tiroidea difusa, una hiperplasia nodular (en la totalidad de la glándula) y finalmente adenomas. La tiroides hiperestimulada, dependiendo del origen de la disminución inicial en la síntesis de hormonas, puede compensar el hipotiroidismo bajo este estímulo, alcanzando los niveles eutiroideos.

Se denomina bocio a todo agrandamiento de la tiroides, apreciable por palpación o inspección. El bocio puede cursar con hiperfunción, hipofunción, o función tiroidea normal. La administración crónica de TSH, o las alteraciones del eje hipotálamo-hipófiso-tiroideo que provocan hiperfunción tirotrófica crónica de la adenohipófisis, producen bocio en diversas especies animales, incluyendo al humano. En animales de experimentación las principales formas de producir bocio son mediadas por el iodo, ya sea por tratamiento con dieta pobre en iodo o por la administración de agentes antitiroideos, que bloquean la organificación del halógeno, como MMI, PTU o los bociógenos naturales de los alimentos. Este bocio se produce con el aumento de TSH circulante inducida por los niveles bajos de hormonas tiroideas séricas. En el humano existen dos causas naturales de bocio: el bocio endémico (297), causado por la carencia crónica de iodo, y el bocio esporádico (298), de etiología variada. Este último tipo de bocio puede deberse a la ingesta de alimentos que contienen compuestos antitiroideos, a desórdenes congénitos que conducen al bloqueo metabólico en la formación y/o liberación de hormonas tiroideas, o a eventuales factores aún no elucidados.

El agrandamiento difuso o nodular de la glándula puede ser maligno (carcinoma) o benigno (difuso: Graves, nodular: adenoma), siendo el bocio la denominación generalmente utilizada para este último tipo de crecimiento patológico tiroideo. El reconocimiento de la naturaleza benigna del proceso se debe a que todo el tejido glandular es normal, a diferencia de los carcinomas, en los que se encuentran masas neoplásicas únicas o en grupos localizados de células anormales, con un fondo de parénquima no neoplásico (299). En los distintos tipos de tumores tiroideos, el crecimiento y la diferenciación no siempre se manifiestan como procesos paralelos. Así, el aumento paralelo de la proliferación y la función glandular, conduce a la formación de un bocio difuso o nodular hiperfuncionante (tóxico); o a un nódulo hipercaptante de iodo (nódulo caliente con hiper o eutiroidismo). Por otra parte, cuando el crecimiento anormal cursa con una disminución o pérdida de función, se denominan nódulos hipocaptantes (o fríos).

Se han descripto múltiples alteraciones genéticas asociadas al metabolismo del iodo, que produce desde la vida fetal un déficit más o menos acentuado en la síntesis y secreción de hormonas tiroideas. El hipotiroidismo asociado induce, por aumento compensatorio de TSH, un bocio que presenta gran avidez por iodo. Los trastornos genéticos que dan lugar al crecimiento anormal de la tiroides son, sin embargo, muy variados. En resumen, las hiperplasias o agrandamientos anormales tiroideos pueden clasificarse en dos categorías principales (300):

- 1-) agrandamientos debido a un exceso de estimuladores tiroideos, extrínsecos a la glándula (exceso de estimulación), por ejemplo:
 - deficiencia de iodo con TSH incrementada (166, 202, 301),
 - TSI (292, 302),
 - factores estimulantes producidos por tumores (303),

- dishormonogénesis con hipotiroidismo;

2-) agrandamiento debido a la aparición de una alteración intrínseca de la glándula (con TSH normal), por ejemplo:

- sensibilidad incrementada a la TSH (caso característico en las deficiencias de iodo) (303, 166, 301),
- activación constitutiva por defectos del rTSH o de las proteínas G asociadas (304, 305),
- anomalías en el transporte de iodo (306, 307),
- falla en la organificación y/o acoplamiento de iodotirosinas, por defectos cuali o cuantitativos en el sistema peroxidasa, o trastornos en otros componentes del sistema de iodinación (308, 309):
 - a) estructura y actividad de la TPO (312, 310),
 - b) ausencia o déficit de la TPO (312, 314),
 - c) localización anormal de la TPO (311, 312, 313, 314),
 - d) producción deficiente de agua oxigenada (313),
- defecto o déficit de la enzima iodotirosil-deshalogenasa, que inhibe la deshalogenación de las iodotirosinas liberadas por hidrólisis de Tg (308),
- alteraciones en la biosíntesis y estructura de la Tg:
 - a) Tg con estructura anormal (315, 316),
 - b) síntesis disminuída de Tg (317, 318),
- trastornos en la secreción y/o transporte de T₃, T₄ por defectos en las proteínas transportadoras.

Se considera que los procesos autoinmunes, en áreas no deficientes de iodo, son la base de muchos de los trastornos tiroideos: desde

mixedema y tiroiditis de Hashimoto (319), enfermedades autoinmunes en las que la producción de hormonas tiroideas se encuentra deprimida; hasta la enfermedad de Graves Basedow, inmunopatía resultado de la aparición de TSI. Se han observado también otro tipo de inmunoglobulinas capaces de unirse al rTSH sin desencadenar respuesta. Más recientemente se han descrito inmunoglobulinas (TGI) estimulantes de la proliferación celular, que fueron sindicadas como responsables de los bocios autoinmunes. Las tres proteínas características del tejido tiroideo: Tg, TPO y rTSH, podrían estar involucradas en las disfunciones autoinmunes, como autoantígenos blanco de la respuesta inmune humoral y celular.

Si bien experimentalmente la TSH induce el crecimiento de células tiroideas *in vivo* y en cultivos celulares, no se ha demostrado una relación directa entre un exceso de TSH y el crecimiento anómalo de la glándula. El análisis detallado de los resultados experimentales provee evidencias confusas respecto del rol que desempeña la tirotrofina sobre el desencadenamiento del proceso hiperplásico. Ratas sometidas a una dieta pobre en iodo o tratadas con agentes antiroideos, sufren un incremento del peso glandular antes de detectarse un aumento en los niveles plasmáticos de TSH (320). Por otro lado, la mayoría de los tumores benignos y malignos, cursan con niveles normales de tirotrofina sérica. De acuerdo a los estudios realizados en zonas endémicas de bocio por carencia de iodo moderada, los niveles séricos de TSH pueden arrojar valores ligeramente aumentados e incluso normales (321). Estos resultados han llevado a postular que la TSH jugaría un papel permisivo en el desenclace hiperplásico tiroideo, pero que existirían otros factores intrínsecos a la glándula, responsables de desencadenar la respuesta bociogena.

Considerando que el grado de diferenciación de un dado tumor es de importancia para la caracterización diagnóstica y pronóstica (321) del

crecimiento patológico, el estudio de la expresión de proteínas características de distintos tumores tiroideos ha sido motivo de recientes investigaciones (321, 322). El estudio de la expresión de las proteínas características del tejido tiroideo en las diversas patologías clasificadas por la clínica y la anatomopatología, se encuentra en sus comienzos. Las caracterizaciones mas abundantes de alteraciones moleculares vinculadas a la Tg, TPO y/o rTSH se ha realizado, fundamentalmente, en bocios de origen congénito. En algunos carcinomas no-funcionantes no se ha podido detectar la presencia de Tg, y en un paciente con hipertiroidismo causado por metástasis de un cáncer de tiroides se ha observado una Tg anómala (323). Otros autores, informaron que el ARNm de Tg se encuentra disminuído en células parcialmente diferenciadas de pacientes con cánceres tiroideos (tumores con patrones trabeculares y/o microfoliculares), respecto de los niveles del mismo mensajero hallados en células bien diferenciadas (tumores papilíferos y foliculares) (324). Monaco y col (325) hallaron que la Tg se encuentra disminuída en dos nódulos fríos y en dos nódulos calientes. Por otro lado, los estudios realizados hasta el momento no han podido demostrar una alteración sistemática del receptor de TSH en tumores tiroideos benignos o malignos (322). El estudio de estos marcadores de diferenciación, en los diversos estadios de desarrollo del crecimiento patológico de la glándula tiroides, constituye una probable herramienta de valor diagnóstico predictivo que la clínica y la anatomopatología no alcanzan a ofrecer.

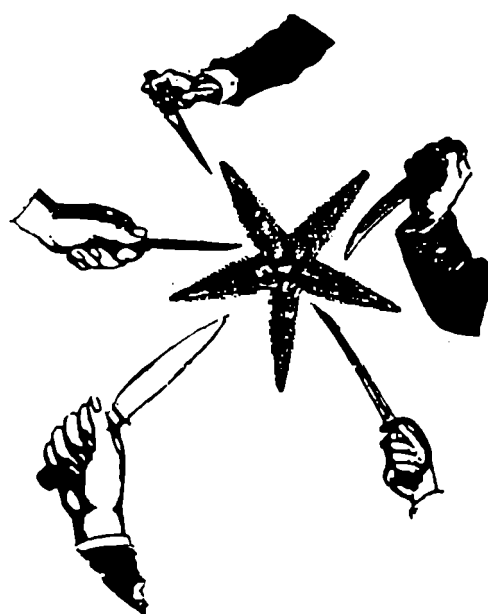
OBJETIVOS

La serie de trabajos constitutivos de la presente Tesis tuvo como objetivo:

1. Investigar la regulación del funcionamiento tiroideo ejercida por la TSH, en presencia de moduladores alternativos de este tejido. En particular se persigue examinar la acción del IK y de la NE sobre aspectos centrales de la fisiología tiroidea, en presencia del estímulo tirotrófico.
2. Evaluar la posible utilidad de distintos parámetros de diferenciación tiroidea, como marcadores de transformación de potencial valor en el diagnóstico de diferentes crecimientos patológicos tiroideos.



MATERIALES Y METODOS



1. MODELOS EXPERIMENTALES

1.1. Células FRTL-5

La línea celular FRTL-5 se encuentra depositada en el "American Type Culture Collection, Rockville, Maryland" (ATCC #8305). Deriva de un clon de células foliculares normales de ratas Fisher, las células FRTL descritas por Ambesi-Impiombato y col (336), que mantiene las principales características funcionales tiroideas luego de períodos prolongados de cultivo. Las células FRTL-5 se diferencian de su clon madre por la capacidad de crecer rápidamente (tiempo de duplicación de aproximadamente de 36 h), por su capacidad de permanecer en ausencia de TSH en estado de quiescencia, y por la sensibilidad a ciertos agentes estimuladores e inhibidores de la función tiroidea luego de períodos prolongados sin TSH. Una vez que se adiciona tirotrófina al medio de incubación de células en estado quiescente, se observa una rápida reconversión morfológica a la forma fusiforme característica de las células foliculares. Las propiedades de este modelo se encuentran reseñadas en "FRTL-5 Today", Ambesi-Impiombato F.S. (eds), Experta Medica, Amsterdam. New York. Oxford. 1989.

Las células FRTL-5 fueron cedidas gentilmente por el Dr L. D. Kohn (NIH Bethesda, MD).

1.1.1. Componentes del medio y mantenimiento

El medio descrito originalmente para estas células y utilizado en este trabajo es el Ham F12 modificado por Coon, suplementado con 5% de suero bovino, 50 U/ml de penicilina, 10 ng/ml de streptomycin y la mezcla de seis hormonas que se detalla a continuación: 10 μ g/ml de insulina, 10^{-8} M de hidrocortisona,

5 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina, 10 ng/ml de acetato de glisil-L-histidil-L-lisina (GHL), 10 $\mu\text{g/ml}$ de somatostatina y 500 $\mu\text{U/ml}$ de TSH. Este medio es el que denominamos 6H. Al mismo medio de cultivo sin suplementar con TSH nos referiremos como 5H. Las células fueron crecidas en estufa a 37°C, en atmósfera de aire enriquecido con 5% de CO_2 . Los medios fueron renovados cada 3 días, excepto en aquellos casos en los que se indique lo contrario.

1.1.2. Repiques

Luego que las células alcanzaron el 100% de confluencia, se realizaron pasajes semanales. El repique se realizó con un cociente de dilución de 1/10, utilizando una solución de colagenasa 20 U/ml, tripsina 0.75 mg/ml y 2% de suero de pollo en medio Hanks' sin Ca^{++} ni Mg^{++} (CTC). Para obtener una suspensión uniforme de células se adicionó EDTA 2 mM. La preparación de el CTC se realizó de la siguiente manera: se disolvió el medio HBSS libre de Ca^{++} y Mg^{++} según especificaciones de fábrica. Se agregaron 750 mg de tripsina (ICN I-300), 20,000 U de colagenasa y 20 ml de suero de pollo, por cada 980 ml de medio HBSS. Se mantuvo 5 h con agitación constante a 4°C; se filtró con filtros de 0.45 μm . Se fraccionó en alícuotas de 20 ml y fue almacenado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

Para el repique de las células se siguió el siguiente protocolo: se aspiró el medio sobrenadante por succión, se lavó con medio 5H sin suero, se adicionó CTC y se incubó en estufa gaseada durante 10 minutos a 37°C, con agitación ocasional. Se agregó el medio "stopping" (medio 6H + 2 mM EDTA), y se mezcló por pipeteo repetido con pipeta de 10 ml. Se incubó nuevamente 10 minutos en estufa. Se transfirió a un tubo estéril y se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, la células

cosechadas fueron resuspendidas en medio 6H, mezclando por pipeteo e inversión. Se realizó la siembra en botellas o placas.

1.1.3. Congelamiento y descongelamiento

Las células originalmente amplificadas, fueron alicuotadas y almacenadas en nitrógeno líquido. El congelamiento se realizó como se detalla a continuación: células cosechadas como se describió en el punto anterior, fueron resuspendidas en medio "stopping" y centrifugadas. Se adicionó una solución de DMSO al 10% en suero fetal bovino, se mezcló por inversión y se congeló en criotubos a -70°C. Luego de 24 h a una semana, las células fueron transferidas a nitrógeno líquido inmediatamente, evitando el descongelamiento.

Para comenzar un cultivo a partir de células congeladas se descongeló un vial por inmersión en etanol 70% previamente calentado a 37°C. Se transfirió su contenido a un tubo estéril conteniendo 10 ml de medio 6H. Luego de 15 minutos, las células fueron centrifugadas 5 minutos a 500 x g y se repitió el lavado. Finalmente se resuspendieron en 15 ml de medio 6H y fueron sembradas. Las células fueron mantenidas en estufa a 37°C, bajo ambiente de 5% de CO₂ y 95% de aire.

1.1.4. Tratamiento de células

Excepto en casos particulares que serán oportunamente señalados, las células FRTL-5 fueron crecidas hasta confluencia en el medio definido como 6H y posteriormente depletadas de TSH durante 7 días (5H), antes de comenzar los tratamientos correspondientes. En toda la serie de experimentos realizados para estudiar el efecto de la NE sobre estas células, el medio base para realizar los tratamientos fue 5H suplementado con ácido ascórbico (10⁻⁴M) y pargilina (1mg/100 ml de medio), ambos inhibidores de la degradación de la NE.

1.2. Animales y tejidos

1.2.1. Ratas

Fueron utilizadas ratas (*Ratus norvegicus*) adultas de cepa Wistar, con pesos entre 150-200 g mantenidas en régimen de iluminación diaria de 14 h (luz 6.00-20.00 h), en ambiente climatizado ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), alimentadas con alimento balanceado "Purina" y agua *ad libitum*. Las glándulas tiroides, en todos los casos, fueron resecadas inmediatamente después del sacrificio y mantenidas en hielo hasta 30 minutos como tiempo máximo previos a su utilización.

1.2.2. Conejos

Para la inmunización con Tg de rata se utilizaron dos conejos machos de 2,5 Kg de peso mantenidos bajo las condiciones de iluminación y temperatura citadas, con alimento balanceado y agua *ad libitum*.

1.2.3. Piezas postoperatorias de tiroides humanas

Piezas operatorias provenientes de tiroidectomías parciales de pacientes humanos con diversas patologías glandulares, fueron recibidas en el momento de la ablación quirúrgica. Inmediatamente fueron colocadas en hielo hasta realizar la caracterización anatomopatológica, siendo congelado el material seleccionado en nitrógeno líquido, donde fue almacenado hasta el momento de su utilización.

2.DISEÑOS EXPERIMENTALES Y METODOLOGIAS

2.1. Purificación de tiroglobulina de tiroides de rata

Tiroides de 60 animales (485 mg de tejido) se homogeneizaron en 10 ml de buffer fosfato de potasio 0.1 M, pH 7, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, a 0°C, con un homogenizador tipo "ultraturrax", y se centrifugaron a 100.000 x g durante 1 h a 4°C. El sobrenadante se almacenó a -20°C en alícuotas de 1 ml hasta el momento de su uso.

Se estandarizó una columna de Sephacril S-300 de 65 cm de alto y 2 cm de diámetro, mediante la separación cromatográfica en buffer fosfato 0.1 M, EDTA 1 mM, a 4°C, de una alícuota de 0.5 ml de 10000 dpm de ¹²⁵I-Tg bovina. Se cuantificó la marca asociada a cada una de las fracciones de 1 ml, recolectadas con un flujo de 0.5 ml/min. La columna fue lavada con la solución vehículo hasta no detectarse radioactividad en el eluido. Se sembraron 0.5 ml del homogenato de tiroides de rata, sin el standard radioactivo, y se corrió en idénticas condiciones experimentales. En las fracciones recolectadas se determinó la concentración de proteínas mediante absorbancia a 280 nm. La ubicación del pico de hemoglobina se identificó por determinación de absorbancia a 410 nm, siendo utilizada como marcador relativo de elución. Las fracciones que eluyeron en la posición correspondiente al pico de tiroglobulina marcada fueron precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) 10% final, incubadas en baño de hielo durante 2 h y posteriormente centrifugadas a 10000g durante 10 minutos a 4°C. Las proteínas precipitadas fueron lavadas 2 veces con TCA 10% a 4°C, se extrajo el TCA remanente mediante 4 lavados con eter etílico saturado en agua, y fueron finalmente analizadas por PAGE-SDS 6%, posteriormente teñido con Coomasie (0.5% de Coomasie Blue R-250 en 45% de metanol,

10% de ácido acético glacial durante 2 h; posteriormente lavado con la 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial).

Una vez caracterizado el perfil de elución e identificado el pico correspondiente a la tiroglobulina, se procedió a la purificación de esta proteína de las fracciones del homogenato obtenido de tiroides de rata, corriendo 1 ml por vez. Las fracciones correspondientes al pico de Tg fueron dializadas para eliminar las sales, liofilizadas y almacenadas a 4°C hasta el momento de su utilización. Se obtuvieron 32 mg de proteína purificada.

2.2. Protocolo de inmunización del conejo con Tg de rata

La Tg de rata fue disuelta en 0.5 ml de solución fisiológica y se realizó una emulsión con igual volumen de adyuvante de Freund incompleto. Con esta preparación se inyectó subcutáneamente el conejo, realizando cada vez 10 habones de 0.1 ml en el lomo. La inmunización se realizó el día 0 con 5 mg de la tiroglobulina de rata obtenida, repitiéndose la operación el día 30 con 7.5 mg de tiroglobulina.

El animal fue sangrado de la oreja el día previo a la primera inmunización (suero preinmune), así como a los 7, 14 y 21 días posteriores al "booster", recolectándose cada vez aproximadamente 15 ml de sangre. Se separó el suero de estas muestras y se almacenó a 4°C hasta su utilización. Una vez realizados los controles correspondientes, los sueros positivos contra Tg de rata fueron juntados y almacenados a -20°C.

2.3. Ouchterlony

Se realizó en base a la metodología descrita por Ouchterlony (492) y Elek (493). Se prepararon portaobjetos cubiertos con Agar 1.5%, preparado en NaCl 150 mM y NaN₃ 0.01%. Luego de realizadas las incisiones (distantes aproxima-

mente 7 mm entre sí, y a 5 mm del pocillo central) se sembraron 3 μ l del suero en el pocillo del centro, 1 μ g de cada una de las distintas Tg, y 4 μ g de proteínas totales de los homogenatos. Se incubó toda una noche en cámara húmeda; se realizaron dos lavados con NaCl 150 mM y se tiñó con Fucsina ácida (0.05 g en 25 ml de alcohol etílico y 5 ml de ácido acético, en un volumen final de 50 ml), durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las placas fueron lavadas dos veces con ácido acético (2 %) y secadas por calentamiento a 50°C.

2.4. Marcación con pulsos de ^{35}S -metionina

Sobre células crecidas hasta confluencia en placas de 24 pocillos o "wells", se realizaron los siguientes tratamientos: control o 5H, IK 10^{-5} M en medio 5H, 6H y 6H conteniendo IK en la concentración indicada. En una serie de experimentos, en lugar de TSH se utilizó But₂AMPc (0.1 mM). Luego de 72 h se lavaron las células con medio 5H, y se incubaron con medio 5H conteniendo 30 μ Ci/ml de ^{35}S -metionina durante 1 h, a 37°C en estufa gaseada. Una vez concluido el período de marcación, las células fueron lavadas dos veces, rápidamente, con buffer PBS a 37°C.

2.4.1. Caracterización electroforética de las proteínas inmunoprecipitadas con el suero hiperinmune obtenido

Se utilizaron células FRTL-5 tratadas como se detalla en el ítem anterior. Las células fueron cosechadas en PBS, y se realizó el fraccionamiento subcelular y las inmunoprecipitaciones con los sueros obtenidos como se describe en el punto siguiente (2.4.2.). Los inmunoprecipitados obtenidos fueron disueltos en 50 μ l de buffer de siembra (3% SDS, 3% glicerina, 7% β -mercapto-etanol, 0.25% de azul de bromofenol, en TBS: 3.03g/l de Tris base, 14.4g/l de glicina), y calentados en baño de agua a 100°C durante 15 minutos, se centrifugaron y

sembraron 20 μ l por calle en PAGE-SDS 6%. El gel obtenido fue fijado durante 2 h en 45% de metanol, 10% de ácido acético glacial, se lavó con una solución de salicilato de sodio 1 M durante 1 h; fue secado y se realizó la autorradiografía.

2.4.2. Cuantificación de la incorporación de ^{35}S -metionina en células FRTL-5

Células sometidas a un pulso de marcación con ^{35}S -metionina, fueron cosechadas en buffer PBS centrifugadas 1 minuto en microcentrífuga, a 4°C. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 0.2 ml por pocillo, de buffer RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, ClNa 150 mM, 1% de Nonidet P-40, 0.5% de deoxicolato de sodio y 0.1% de SDS) a 4°C. Las muestras fueron incubadas en hielo durante 1 h, y se realizaron agitaciones ocasionales. Los homogenatos obtenidos fueron centrifugados a 12,000 x g durante 10 minutos; el precipitado fue descartado. Los sobrenadantes se utilizaron inmediatamente o fueron congelados a -20 °C por períodos no mayores de 1 semana. Se realizaron las siguientes determinaciones:

- Marca total incorporada: En 5 μ l de cada sobrenadante se cuantificó la radioactividad total.
- Incorporación del aminoácido marcado a proteínas totales: por cada 10 μ l de sobrenadante se adicionaron 10 μ l de una solución de albúmina (1 mg/ml), 1 ml de agua destilada, y ácido TCA hasta una concentración final del 10%; se incubó durante 2 h en baño de hielo y se centrifugó a 7000 x g durante 15 minutos. El precipitado fue lavado 3 veces con TCA al 10% a 4 °C y se disolvió en 50ml de ácido fórmico y se procedió a la cuantificación de la marca asociada.
- Incorporación de ^{35}S -metionina a Tg: Se tomaron 10 μ l de homogenato, se agregaron 5 μ l del suero hiperinmune anti-Tg diluído 1/10 en buffer Tris/HCl 150 mM, pH 7.4, NaCl 50 mM ($\text{T}_{150}\text{Na}_{50}$), y se llevó el volumen a 200 μ l con el

mismo buffer. Se incubó a 37°C durante 2 h, y se adicionaron 20 μ l de una solución del anticuerpo específico anti-IgG de conejo, diluido 1/5 en T₁₅₀Na₅₀, gentilmente cedido por los Dres E. Charreau y L. Bujssmann. Se incubó toda la noche a 30°C y se centrifugó 10 minutos a 4 °C en microcentrífuga, a 12000 x g. El precipitado obtenido fue lavado dos veces con T₁₅₀Na₅₀ a 4°C, se disolvió en 50 μ l de ácido fórmico y se cuantificó la radioactividad. El mismo procedimiento se realizó en otra alícuota de cada homogenato, sustituyendo el suero hiperinmune de la primera incubación con el suero preinmune del mismo conejo en idéntica dilución, como control de inespecificidades. La cantidad de radioactividad asociada a Tg se estimó como la diferencia de actividades precipitadas con el suero hiperinmune anti-Tg y el suero inespecífico o preinmune.

2.4.3. Estudio de la liberación de proteínas marcadas con ³⁵S-metionina

En células confluentes se realizó un pulso de marcación en medio 5H conteniendo ³⁵S-metionina (5 mCi/ml), durante 1 h a 37°C en estufa gaseada. Se realizaron rápidamente tres lavados con 2 ml de PBS previamente calentado a 37°C. Se adicionaron los medios de tratamiento, preparados en medio 5H, en ausencia de suero bovino: control, IK, TSH, TSH + IK, en las concentraciones antes mencionadas. Al cabo de 3 h de incubación a 37°C y bajo atmósfera de 5% CO₂, los sobrenadantes fueron extraídos y centrifugados 10 minutos a 1500 x rpm. En el mismo se estudiaron las proteínas liberadas mediante la cuantificación de la radioactividad asociada a la fracción insoluble en TCA 10% y su separación en PAGE-SDS .

2.5. Determinación de AMPc

Luego del tratamiento de las células, se aspiraron los medios de incubación y se realizó una extracción celular con TCA 10%. Las alícuotas fueron centrifugadas a 1500 x g durante 5 minutos con el objeto de remover proteínas insolubles. El contenido de AMPc de los extractos fue ensayado por medio de un RIA para AMPc ("New England Nuclear"), luego de extraer el TCA remanente con éter etílico saturado en agua.

2.6. Estudios del contenido de ARN total y ARNm

En células FRTL-5 crecidas hasta confluencia en placas de 6 cm de diámetro, se estudió, por un lado, el efecto del IK y de la NE sobre la acumulación de ARN total y ARNm de Tg, estimulada por TSH, mediante el siguiente protocolo:

- Estudio del efecto de yoduro: Los tratamientos fueron realizados durante 72 h en los medios 5H, 5H+IK, 6H y 6H+ IK, en las concentraciones indicadas en el punto 2.4.
- Estudio del efecto de la NE: Se trataron las células durante 24 y 48 h, en medio 5H, 6H y 6H + NE (10^{-5} M); utilizándose la misma concentración de TSH y la mezcla de inhibidores de la degradación del neurotransmisor previamente mencionada (1.1.4.).

Por otro lado, en células crecidas en iguales condiciones a las mencionadas, se investigó el efecto de estos agentes sobre la estabilidad del ARNm de Tg, de acuerdo con el siguiente protocolo experimental:

- Estudio del efecto del yoduro: Se trataron las células durante 72 h en medio 5H, 5H+IK, 6H y 6H+IK en las concentraciones indicadas.
- Estudio del efecto de la NE: Las células fueron incubadas en medio 5H, 6H y 6H + NE durante 48 h, en las condiciones citadas.

Una vez finalizados estos tratamientos se adicionó a los medios, actinomicina D (ActD) hasta una concentración final de 5 $\mu\text{g/ml}$. Se definió entonces el instante 0 h de inhibición. Para cada tratamiento realizado, las células fueron cosechadas a las 0, 3 y 6 h.

Una vez concluidos los tratamientos, se descartaron los medios, se realizaron dos lavados con PBS estéril y se purificó el ARN total, como se describe (2.6.1).

2.6.1. Purificación de ARN total

La extracción y purificación del ARN se realizó de acuerdo a lo descrito por Chomczynski y Sacchi (494). El mismo consiste en la disrupción celular en la solución de extracción (sn D: tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25 mM, sarcosil 0.5 %, 2-mercapto-etanol 0.1 M, pH 7). Cuando se extrajo ARN de células FRTL-5, la homogeinización se realizó por el agregado de la sn D sobre la monocapa de células previamente lavadas con PBS estéril; en cambio, cuando se partió de tejido se utilizó un homogeinizador tipo "ultratúrrax" (1ml de sn D/100 mg de tejido). Por cada 1 ml de homogenato obtenido se adicionó, secuencialmente y mezclando por inversión luego de cada agregado: 0.1 ml de acetato de sodio 2 M, pH 4; 1ml de fenol saturado en H_2O y 0.2 ml de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1). La suspensión final se agitó vigorosamente durante 10 segundos y se incubó 15 minutos a 0°C. Se centrifugaron a 10.000 x g durante 20 minutos, a 4°C, y se extrajo la fase acuosa. El ARN presente se precipitó con un volumen de isopropanol a -20°C durante toda la noche, y una centrifugación de 20 minutos a 10.000 x g a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con 200 μl de etanol 75%, se secó y resuspendió en la mitad del volumen original de sn D. Se repitió la precipitación con alcohol isopropílico y el precipitado fue disuelto en el mínimo volumen de H_2O libre de

ARNasas. En una alícuota de cada muestra obtenida se determinó la concentración de ARN por absorbancia a 260 nm y la relación de absorbancias a 260 y 280 nm. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de su utilización.

2.6.2. Dot Blot y Northern Blot

Para los Dot Blots fueron utilizadas membranas "Gene Screen" de nylon, previamente humedecidas en SSC 2x (SSC 1x: 0.3 M NaCl, 3M de citrato de Na) durante 10 minutos. Utilizando un aparato "Hybri-Dot Manifold" se sembraron 100 μ l del ARN total diluído en SSC 10x, en concentraciones decrecientes. Los filtros obtenidos fueron secados a 80°C durante 2 h, y posteriormente hibridizados.

Para los estudios de Northern Blot, los ARN totales fueron precipitados, resuspendidos en buffer de siembra (50% de formamida, 10mM fosfato de Na, pH7, 0.66M formaldehído) y desnaturalizadas por calentamiento a 60°C durante 10 minutos, y sometidos a la separación electroforética en geles de agarosa 1%, conteniendo 0.66 M de formaldehído. Los ARN presentes en el gel fueron transferidos por vacío a membranas tipo "Gene Screeen" de nylon, posteriormente fijadas por calentamiento a 80°C durante 2 h.

Para las hibridizaciones de estos filtros fueron utilizadas las siguientes sondas:, los ADNc del rTSH, TPO y Tg humana, así como de Tg de rata, fueron gentilmente cedidos por el Dr G. Vassart ("Université Libre de Bruxelles", Bélgica) mientras que el ADNc de TTF-1 fue provisto por el Dr R. Di Lauro ("Stazione Zoologica Alberto Dohrn, Napoles", Italia). Las mismas fueron marcadas por "random primer extention" con 32 P-dCTP de acuerdo a las especificaciones del kit comercial de Dupont, NEN. Las hibridizaciones fueron realizadas como se indica en el catálogo de la membrana, luego de 6 h de

incubación en buffer de prehibridización y durante 24 h a 42°C, en buffer conteniendo 50% de formamida. Los filtros fueron lavados, se realizaron las autorradiografías correspondientes y se las analizó densitométricamente.

2.7. Ensayos de transfección

Se sembraron aproximadamente 10^6 células FRTL-5 en placas de 10 cm de diámetro y fueron incubadas en estufa gaseada a 37°C, durante 10 h en medio 6H. Las células adheridas (aproximadamente al 50% de confluencia) fueron transfectadas por el método del Cl_2Ca (495) según se detalla a continuación: Se realizó una coprecipitación del Ca^{++} conjuntamente con el plásmido (15 μg de pbTgCAT₂ o 6 μg de pSV₂CAT/ placa). Para ello se mezclaron 0.5 ml de solución de Hepes 2x (1g HEPES, 1.6 g NaCl, 0.074 g de KCl, 0.025 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0.2 g de glucosa, cada 100 ml de solución, pH 7.5), 10 μl del plásmido diluido y 490 μl H_2O ; con agitación constante. En todos los casos se realizó un control de transfección con la mezcla citada pero sin plásmido. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó, gota a gota, mientras se agitaba continuamente, 60 μl de una solución de Cl_2Ca 2M. Luego de 10 minutos a temperatura ambiente, la mezcla fue sembrada sobre las células sin medio. Se incubó a 37°C durante 30 minutos con agitaciones ocasionales. Se adicionaron 8 ml de medio 5H a cada caja y se incubó en estufa gaseada toda la noche a 37°C. Luego de controlar al microscopio la presencia de un fino precipitado sobre la superficie celular, se aspiró el medio de cultivo y se agregaron 2ml de glicerol 15% en HBS a 37°C, durante 30 segundos. Concluida esta incubación, se aspiró el glicerol y se lavaron las células dos veces con medio 5H sin suero. Se agregaron 10 ml de medio 5H completo, y luego de 24 h se realizaron los siguientes tratamientos: medio 5H, 5H+IK, 6H y 6H+IK, en las concentraciones mencionadas previamente, durante 48 h. Finalizado este

período, las células fueron cosechadas y se examinó la actividad citoplasmática de la enzima cloranfenicol-acetil-transferasa (CAT) (2.7.1.).

2.7.1. Actividad de CAT

Las células tratadas como se indica (2.7.), fueron lavadas 2 veces con PBS, y resuspendidas en una solución 40 mM de Tris-HCl, pH 7.5, 1mM EDTA y 150 mM de NaCl (TNE). El precipitado obtenido en la centrifugación a 6000 rpm de esta suspensión fue resuspendido en 0.1 ml de Tris-HCl 250 mM, pH8, 5mM EDTA. Se realizaron incubaciones alternativas, de 5 minutos cada una, en hielo seco/e-tanol y en baño a 37°C, y finalmente se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante fue calentado a 60°C durante 10 minutos y se repitió la centrifugación. Con el sobrenadante obtenido se procedió la determinación de la actividad enzimática.

La mezcla de reacción consistió en: 50 μ l del extracto celular, 4 μ l de una solución 20 mM de Acetil CoA, 16 μ l de H₂O, 10 μ l de ¹⁴C-cloranfenicol (0.025 μ Ci/ μ l) y 70 μ l de una solución. 250mM Tris-HCl, pH8, 5mM EDTA. Se incubó durante 30 minutos a 37°C, se adicionaron 4 μ l de 20 mM AcetilCoA y se repitió la incubación. Se finalizó la reacción por el agregado de 0.5 ml de acetato de etilo. Se realizaron dos extracciones de la fase acuosa con acetato de etilo, y las fases orgánicas fueron evaporadas, resuspendidas en 20 μ l de acetato de etilo y sembradas en una placa de TLC, que se resolvió utilizando cloroformo : metanol (95:5). La radioactividad asociada al cloranfenicol acetilado fue cuantificada mediante el análisis densitométrico de las autorradiografías obtenidas de las TLC.

2.8. Ensayos de captación y liberación de ^{125}I

En todos los casos se utilizaron células crecidas hasta confluencia en placas de 24 wells. Los tratamientos fueron realizados en medio suplementado con los inhibidores de la degradación de NE antes mencionados (2.1), en los tiempos que se indican en cada caso. Excepto en los casos en los que se aclare expresamente lo contrario, la concentración de NE utilizada fue de 10^{-5} M y la de TSH de 500 $\mu\text{U/ml}$ de medio. En una serie de experimentos se utilizó But_2AMPc (0.1 mM) en lugar de TSH, en el mismo medio base y en los tiempos indicados. En la caracterización del receptor noradrenérgico se utilizaron los siguientes compuestos: fenilefrina (10^{-5} M), prazosín (10^{-8} M), clonidina (10^{-5} M), isoprote-renol (10^{-5} M), yohimbina (10^{-6} M) y propanolol (10^{-5} M). Para el estudio del mecanismo de acción de la NE sobre la captación del halógeno se utilizó ActD (1 $\mu\text{g/ml}$ de medio), agregada al medio de incubación transcurridas 24 h del inicio de los tratamientos correspondientes.

2.8.1. Captación de ^{125}I

Las células tratadas fueron lavadas con PBS a 37°C. Se agregan 0.5 ml por pocillo, de una solución de 0.1 μCi de ^{125}I /ml de medio Conn's F12 sin suero ni hormonas, suplementado con 10^{-5} M de IK. Se incubó a 37°C, durante 1 h y media. Los medios fueron retirados, se lavó rápidamente con el mismo medio base sin el sustrato radioactivo y se adicionaron 0.5 ml de NaOH 0.3 N por pocillo y se incubaron 24 h a temperatura ambiente. Se analizó la radioactividad presente en una alícuota de cada tratamiento.

2.8.2. Liberación de ^{125}I

Las células fueron tratadas durante 72 h con TSH y NE en las concentraciones y el medio descrito previamente (2.8.), se realizaron 2 lavados con medio 5H y se incubaron durante 1 h con medio 5H conteniendo 1 μCi de $^{125}\text{I}/\text{ml}$ y 10^{-5}M de IK. Se lavó rápidamente con 5H a 37°C y se fue cambiando el medio cada 2 minutos. La radioactividad liberada se expresó como porcentaje de la marca captada en el estado estacionario (o contenido inicial).

2.8.3. Determinación de los parámetros cinéticos del transportador de yodo

En células sometidas a los tratamientos que se indican en cada caso, durante 72 h, se realizó una incubación de 3 minutos con 1 μCi de $^{125}\text{I}/\text{ml}$ en medio 5H conteniendo distintas concentraciones de IK frío. Las células fueron lavadas rápidamente con medio 5H a 37°C y se procedió a cuantificar la radioactividad asociada.

2.9. Evaluación del crecimiento

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos. Se sembraron aproximadamente 100000 células/ml, 1ml por well, en medio 6H. Luego de 48 h fueron depletadas de TSH (medio 5H) por 72 h, al cabo de lo cual fueron sometidas a los tratamientos que se indican. Posteriormente se evaluó el contenido total de ADN/ well, como se detalla en 2.9.1.

2.9.1. Determinación de ADN de células

Las células sometidas a los distintos tratamientos fueron despegadas de la placa mediante la incubación con 0.5 ml de EGTA 2 mM, en buffer PBS a 37°C . Esta suspensión celular fue sonicada, se adicionaron 50 μl de NaOH 1N, se

incubaron 20 minutos a 60°C y se neutralizó cada alícuota con HCl 1N, a 0°C. La determinación del contenido de ADN se realizó mediante el método de Labarca y Paigen (496), utilizando bisbenzimidaz (Hoechst 33258). La fluorescencia fue determinada con un fluorómetro para ADN ("Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA"), y la concentración de ADN fue colegida por comparación con soluciones standard.

2.10. Captación de ^3H -deoxiglucosa

Luego de realizados los tratamientos que se indiquen, las células cultivadas en placas de 24 wells fueron lavadas 3 veces con buffer Krebs-Ringer sin glucosa. Se realizó una incubación de 30 minutos, a 37°C, en presencia de 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -deoxiglucosa (DOG) (30.2 Ci/mmol) en buffer Krebs-Ringer libre de glucosa. Los valores inespecíficos se obtuvieron por el mismo tratamiento en buffer Krebs-Ringer en presencia de 100 mM de glucosa. Se realizaron 3 lavados en esta solución en baño de hielo, se adicionaron 0.5 ml de NaOH 0.1M a cada well y luego de 24 h de incubación a temperatura ambiente se analizó la marca asociada.

2.11. Captación de ^3H - α -aminoisobutírico

Las células FRTL-5 fueron cultivadas en placas de 24 wells y fueron sometidas a los tratamientos que se indican. Posteriormente fueron lavadas con solución Earle-Hepes, pH 7.4 y se incubaron con 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H - α -aminoisobutírico (AIB) (25 Ci/mmol) durante 30 minutos, a 37°C. Se realizaron 3 lavados con buffer Earle-Hepes en baño de hielo, se adicionaron 0.5 ml de NaOH 0.1M a cada well y luego de 24 h de incubación a temperatura ambiente se analizó la radioactividad presente en una alícuota de cada tratamiento.

2.12. Tratamiento de ratas

2.12.1. Determinación del efecto del iodo sobre la actividad de TPO

50 ratas fueron distribuidas en 5 grupos de 10 ratas cada uno. Los tratamientos fueron realizados mediante la administración de:

- IK en solución fisiológica, inyectado intraperitonealmente en una única dosis diaria de 0.5 mg.
- T₄ en el agua de bebida, en una concentración de 80 µg/ 20 ml.
- TSH 100 mU/0.1ml/dosis, en solución fisiológica, fue administrada intraperitonealmente.

En el caso de animales que no recibieran uno o varios de los agentes indicados, se realizó la inyección o la sustitución del agua de bebida, con los vehículos correspondientes. La duración del tratamiento fue de 1 semana. Los distintos grupos de animales recibieron la siguiente combinación de agentes:

- 1- Grupo control: los animales fueron sometidos al tratamiento con los vehículos de los agentes antes mencionados, en los tiempos que corresponden.
- 2- Grupo IK: A partir del tercer día y hasta la finalización de los tratamientos, se administró diariamente la solución de IK.
- 3- Grupo T₄: La administración de tiroxina, con el objeto de deprimir los niveles plasmáticos de TSH, se comenzó el día 2 y duró hasta la finalización del tratamiento.
- 4- Grupo T₄-TSH: ratas tratadas como en el grupo anterior, fueron inyectadas con TSH 16 y 6 h previas al sacrificio de los animales.
- 5- Grupo T₄-TSH-IK: Con el fin de evaluar el efecto del yoduro en la respuesta a TSH en el parámetro en cuestión, a animales tratados según se describió en el grupo anterior se les administró IK intraperitonealmente, según se ha

descripto.

Una vez finalizados los tratamientos, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, y las tiroides fueron inmediatamente procesadas para la evaluación de la actividad enzimática de TPO como se describe más adelante.

2.12.2. Determinación del efecto de la desnervación simpática unilateral crónica de la tiroides, sobre la actividad de TPO

Grupos de 10 ratas normales fueron sometidas a la gangliectomía cervical superior unilateral izquierda, y sobre una población idéntica de animales se efectuó la operación simulada, como se detalla a continuación:

Bajo anestesia etérea, se expusieron las glándulas salivales mediante una incisión ventral en el cuello y se las separó lateralmente con el objeto de exponer los músculos suprahiodeos. Se divulsionaron dichos músculos hasta una profundidad cercana a la arteria carotídea entre las ramas interna y externa; una vez identificado se lo resecó cuidadosamente con el propósito de no provocar hemorragias. En los animales control con operación simulada, se procedió de la misma manera sólo hasta la visualización del ganglio sin extirparlo. Las GCSxu consistieron en resecar el ganglio izquierdo y visualizar el contralateral. El criterio seguido para confirmar la GCSx consistió en la detección de las siguientes secuencias temporales de fenómenos en ojo correspondiente al lado operado:

- a) Ptosis palpebral hasta 10 h de transcurrida la operación.
- b) Retracción palpebral y exoftalmo moderado entre las 10 y 24 h posteriores a la cirugía
- c) Ptosis irreversible después de las 24 h.

Estas son las fases de la reacción de degeneración Walleriana temprana a nivel de los músculos periorbitarios (497) .

Durante 7 días los animales fueron mantenidos en ritmo normal de luz-oscuridad, bajo alimentación standard y agua *ad libitum*. Luego de 7 días se realizó el sacrificio mediante dislocación cervical y se procedió a la purificación parcial de la enzima TPO de los lóbulos tiroideos disecados, de acuerdo al protocolo que se detalla a continuación.

2.13. Determinación de la Actividad Enzimática de Tiroperoxidasa (TPO)

Fue utilizada la técnica descrita por De Goot y Davies (498). En primer lugar se realizó la purificación parcial de la enzima asociada a membrana celular. Con tal fin, los lóbulos tiroideos de rata disecados o aproximadamente 50 mg de tejido tiroideo humano, fueron homogeneizados en 1ml de buffer fosfato de potasio 1 mM, pH 8, conteniendo 0.1 mM de IK. Las suspensiones obtenidas fueron centrifugadas a 800 x g durante 15 minutos en frío, y el sobrenadante fue entonces centrifugado durante 1 h a 100.000 x g a 4°C; la fracción microsomal obtenida en el pellet fue disgregada, mediante un pistón de teflon, en 500 μ l de una solución fosfato 1 mM, pH 8, 0.1 mM de IK y 0.6% de tritón X-100, a 0°C. Por agitación durante 3 h en esta solución a 0°C y luego de una centrifugación a 12.000 x g a 4°C en microcentrífuga, se extrajo la actividad de TPO del precipitado membranoso. En una alícuota de los sobrenadantes obtenidos se determinó la concentración de proteínas y el resto fue almacenado a -80°C hasta el momento del ensayo de la actividad enzimática.

Las alícuotas, tomadas por triplicado, fueron llevadas a un volumen final de 0.5 ml con solución de fosfato de potasio 100 mM (buffer fosfato), pH 7. Se adicionaron 0.3 ml de Solución A (SN A: buffer fosfato, tirosina 3×10^{-3} M, glucosa 3×10^{-3} M, IK 3×10^{-5} M y 0.1 μ Ci de 125 I-Nal). También se realizaron tres blancos y tres testigos, para la determinación de la marca inespecífica y la marca total ofertada, respectivamente (con buffer fosfato en

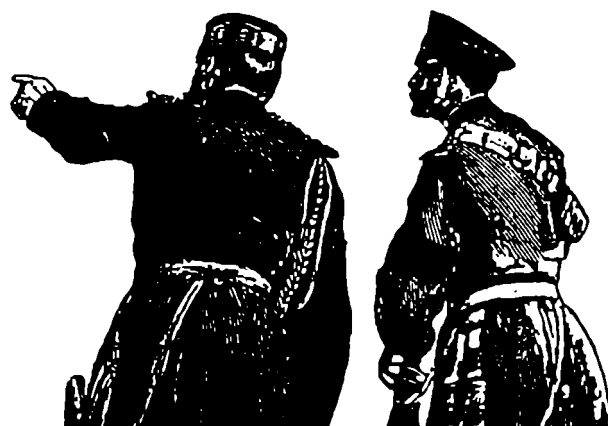
lugar de extracto). La reacción de iodinación se inició por el agregado de 500 μl de una solución de glucosa oxidasa de 1 mg/ml en buffer fosfato durante 20 minutos a 37°C, con agitación constante. El ensayo se detuvo por el agregado de 50 μl de HCl concentrado y 50 μl de $\text{S}_2\text{O}_3\text{Na}_2$ 25% (P/V). Se agitó e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para la separación de las tirosinas libres y iodinadas del iodo libre, se agregó 1 ml de resina Dowex 50-X-8 y se incubó a 37°C durante 10 minutos con agitaciones ocasionales. Se separaron los testigos y los tubos restantes se lavaron 10 veces con H_2O destilada. Para estimar la marca asociada a tirosinas unidas a la resina se restó de cada determinación el valor del blanco (aproximadamente el 8% de la marca total del control).

2.14. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se utilizaron los tests de Student para la comparación de 2 muestras y de varianza (ANOVA) seguido por Dunnet Tukey para las comparaciones múltiples. Para la significación de las rectas de correlación se utilizaron las fórmulas de Snedecor y Cochran (499).



RESULTADOS Y DISCUSION



1. MODULACION DE LA RESPUESTA TIROIDEA A TSH

El conjunto de evidencias disponibles coinciden en señalar a la TSH hipofisaria como el principal modulador de la función tiroidea. La interacción de la tirotrófina con su receptor estimula prácticamente todas las funciones diferenciadas de las células foliculares (la captación de yodo (27), la iodinación de Tg (7, 326, 327), la síntesis de Tg (146), la liberación de hormonas tiroideas (328), entre otras) y el crecimiento tisular (329). Considerando que en ausencia de este estímulo, el metabolismo tiroideo se reduce a una mínima expresión, podría entenderse a la TSH como la "señal de encendido" de la tiroides. Sin embargo, de acuerdo a lo señalado en la *Introducción*, la modulación del funcionamiento de un dado tejido debe entenderse como una compleja red de pasos regulatorios cruzados, en la cual las señales intra y extracelulares actúan sobre sus receptores como "bits" de información en un circuito electrónico sin un significado fisiológico definido *per se* (67). En el caso particular de la tiroides, se han identificado numerosos moduladores alternativos que afectan la función tiroidea, incluso modificando la respuesta a la TSH. Esta compleja red de información responde más acabadamente a un modelo regulatorio capaz de lograr cambios adaptativos sutiles en respuesta a distintos requerimientos homeostáticos, cuando se la compara con la acción generalizada y pleiotrópica de la TSH únicamente. Al respecto, se ha descrito el efecto modulador del yodo, sobre algunos parámetros relacionados con la síntesis y secreción de hormonas tiroideas y el crecimiento, estimulados por TSH, en el marco de lo que se ha denominado "autorregulación tiroidea" (166). Por otro lado, la confirmación de la presencia de terminales simpáticas noradrenérgicas en estrecho contacto con las células foliculares ha conducido al

estudio de los efectos de la NE sobre algunos aspectos de la función tiroidea bajo la acción del estímulo hipofisario (13, 330).

Dadas estas consideraciones, se decidió evaluar en detalle el efecto de dos moduladores alternativos, el yodo y la NE, sobre la principal señal de "encendido" de la tiroides, particularmente sobre ciertos parámetros relacionados con la función diferenciada y el crecimiento tiroideo.

1.1. EFECTOS DEL IODURO SOBRE DISTINTOS ASPECTOS DE LA FUNCION TIROIDEA

De acuerdo a las evidencias experimentales detalladas en la *Introducción*, el iodo es un componente clave de la fisiología tiroidea, no sólo en cuanto a su condición de componente de las hormonas sintetizadas en este tejido, sino también en su función de regulador de la actividad glandular (166). No obstante la importancia primaria de la TSH sobre la estructura y la función tiroidea, las respuestas frente a variaciones en la disponibilidad de iodo son, fundamentalmente, independientes de la acción primaria del halógeno en el balance establecido por la interrelación hipotálamo-hipófiso-tiroidea en la secreción de TSH. De hecho, estas acciones moduladoras sobre la tiroides pueden ocurrir en ausencia, o bajo condiciones en las que la presencia de TSH es constante. Por esta razón, el conjunto de efectos del iodo sobre la tiroides ha sido denominado "autorregulación", aludiendo a eventos intrínsecos a la glándula. Sin embargo, dado que la ausencia de TSH no posee un significado fisiológico relevante (excepto en casos raros de hipofunción hipofisaria), los mecanismos autorregulatorios considerados de valor homeostático son aquellos capaces de modificar la respuesta de la tiroides a la TSH (331).

Las acciones del iodo en diversas etapas críticas de la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, así como del crecimiento y metabolismo general de las células foliculares, son evidentes tanto en condiciones de exceso como de déficit del halógeno. Los excesos del iodo generalmente provocan una disminución en la actividad metabólica folicular estimulada por TSH, mientras que el déficit refleja una acción fundamentalmente paralela y de signo contrario (166). Los efectos autorregulatorios de este halógeno participan en muchos aspectos de la función tiroidea, incluyendo el

mecanismo de transporte y organificación de yodo, la síntesis y secreción de hormonas tiroideas, y el metabolismo intermedio (164). A pesar de que su mecanismo de acción resulta aún elusivo, las evidencias disponibles apuntan a la existencia de un intermediario organificado de naturaleza no proteica (332-334).

Las células FRTL-5 constituyen un modelo apropiado para el estudio de muchos aspectos de metabolismo tiroideo (208, 335, 336). En este modelo, la expresión de los genes de Tg y TPO, así como los procesos de captación, liberación y organificación de yodo son dependientes de TSH (27, 35, 142, 336-339). Sin embargo, a pesar de que el proceso de organificación en este modelo es suficiente para el estudio de los efectos dependientes del yodo organificado (340-342), no permite el estudio de la modulación enzimática de la TPO, purificada de extractos de membrana (343). Dadas estas consideraciones, se ha utilizado el modelo experimental de las células FRTL-5 en el estudio de los efectos del yoduro de potasio sobre la síntesis de Tg y la proliferación celular, estimuladas por TSH. Por otro lado, para la evaluación del mecanismo autorregulatorio vinculado al proceso de organificación de yodo, se utilizaron ratas tratadas *in vivo* y se evaluó la actividad tiroidea de TPO *ex vivo*.

1.1.1. Síntesis de Tg

La tiroglobulina (Tg) constituye el andamiaje sobre el cual se sintetizan y almacenan las hormonas tiroideas en el lumen folicular (34, 344). De las proteínas sintetizadas por las células foliculares, la Tg es la más abundante y su síntesis se encuentra bajo el control positivo de la TSH (35, 112, 123, 345). En consecuencia, en el marco del estudio de los mecanismos autorregulatorios del yodo, se consideró de interés evaluar el efecto del exceso del halógeno sobre la síntesis de esta proteína, esencial en la fisiología tiroidea. Con tal objeto se

examinó la regulación por yoduro de diversas etapas asociadas a la síntesis y liberación de Tg.

Con el objeto de monitorear los niveles de Tg frente a diversas situaciones experimentales, en una primera etapa se desarrolló un suero hiperinmune específico contra esta proteína. La estrategia empleada consistió en la purificación de Tg de tiroides de rata, mediante una columna de tamiz molecular (Sephacril S-300). En cada una de las fracciones de 1 ml se cuantificó la absorbancia a 280 y 410 nm, con el fin de determinar la cantidad aproximada de proteínas e identificar la presencia de hemoglobina, respectivamente. El perfil de elución obtenido se representa en la Figura 9. El pico de hemoglobina fue utilizado como marcador relativo de peso molecular de las proteínas eluidas. En el mismo gráfico, se representa el perfil de elución de un standard de Tg bovina marcada con ^{125}I , corrido en idénticas condiciones experimentales.

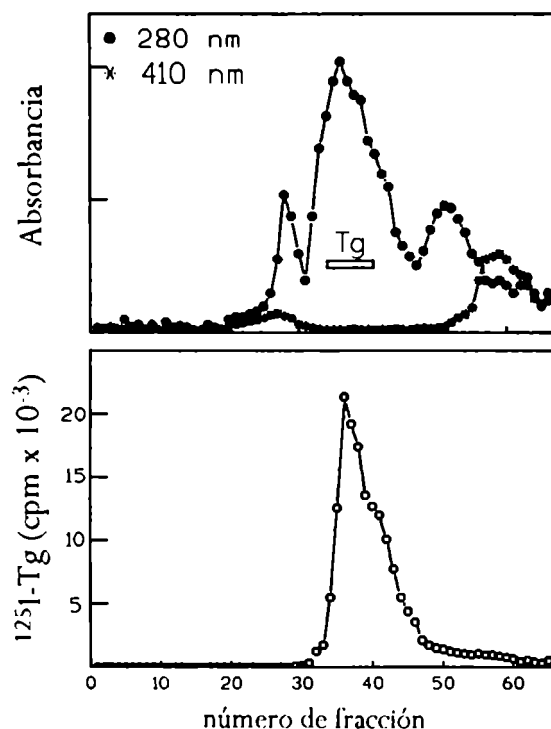


Figura 9. Perfil de elución del sobrenadante del homogenato de tiroides de rata, en una columna de Sephacril S-300. En el panel superior se representan los valores de absorbancia a 280 nm y 410 nm de las respectivas fracciones eluidas de la columna. Se indican las fracciones seleccionadas para el protocolo de inmunización. En el panel inferior se representa el perfil obtenido a partir de una solución standard de ^{125}I -Tg de origen bovino.

Con el objeto de comprobar la pureza de la Tg contenida en el pico, las proteínas concentradas de las fracciones 25 a la 42 fueron sometidas a una separación electroforética en un gel de poliacrilamida y posterior tinción con Coomasie Blue. La banda correspondiente a Tg se caracterizó por la corrida comparativa con standards de peso molecular conocido. El resultado obtenido se representa en la Figura 10.

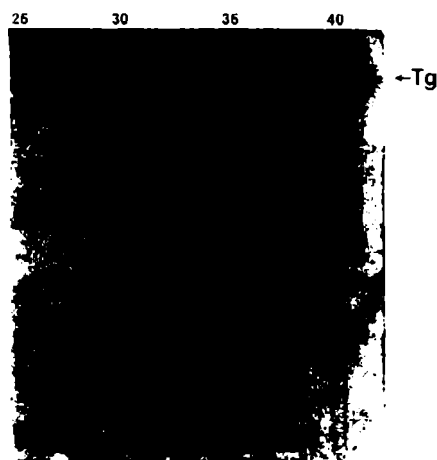


Figura 10. Gel de poliacrilamida (6%) teñido con Coomasie Blue, de las fracciones 25 a 42, eluidas de la columna de Sephacril S-300. La banda correspondiente a Tg se identificó a partir de una corrida en paralelo con patrones de peso molecular conocido.

La Tg obtenida de las fracciones 33 a 41 fue utilizada para la inmunización de dos conejos, de acuerdo al protocolo detallado en *Materiales y Métodos*. Los sueros obtenidos previo a la primera, y posteriores a la segunda inmunización (sueros preinmune e hiperinmunes respectivamente) fueron enfrentados en placas de Ouchterlony con Tg purificada de rata o Tg bovina, y a homogenatos de tiroides de rata, canina o humana. En la Figura 11 se observa que únicamente se forman bandas de precipitación entre el suero hiperinmune

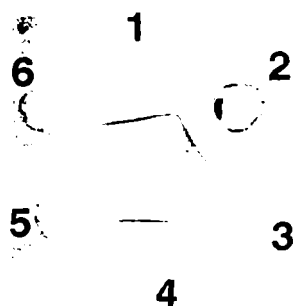


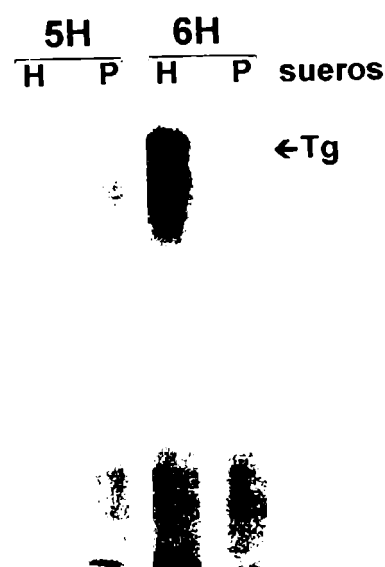
Figura 11. Ouchterlony representativo de los sueros hiperinmunes obtenidos en el protocolo de inmunización descrito en *Materiales y Métodos*, enfrentados a:

1 y 4: Tg de rata, 2: homogenato de tiroides de rata, 3: homogenato de tiroides canina, 5: homogenato de tiroides humana, 6: Tg bovina. Se observan bandas de precipitación únicamente en las muestras 1, 2 y 4.

obtenido y la Tg de rata o la muestra correspondiente al homogenato de tiroides del mismo animal. La validación del antisuero en el modelo experimental

utilizado para los estudios de síntesis de Tg, se realizó mediante una inmunoprecipitación doble del "pool" endógeno de proteínas marcadas con ^{35}S -metionina (^{35}S -met), contenido en células FRTL-5 tratadas en medio control (5H) o en presencia de TSH (0.5 mU/ml, medio 6H) durante 48 h. Para ello, se incubaron alícuotas del sobrenadante de la homogenización celular con los sueros obtenidos y se realizó la precipitación mediante el agregado de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo. En la Figura 12 se muestra la autorradiografía de un gel de poliacrilamida de los inmunoprecipitados obtenidos. El análisis de los resultados obtenidos sugiere que el sistema de doble precipitación con los antisueros obtenidos es apropiado para la identificación de la Tg en el sistema experimental seleccionado.

Figura 12. Autorradiografía de un gel de poliacrilamida (6%) de los inmunoprecipitados obtenidos como se detalla en *Materiales y Métodos*, en presencia de suero de conejo preinmune (P) o hiperinmune (H) anti-Tg de rata. Las células fueron tratadas durante 72 h en medio 5H o 6H, luego de lo cual fueron expuestas a un pulso de ^{35}S -met durante 1 h. Los homogenatos resultantes fueron centrifugados e inmunoprecipitados con los sueros respectivos. El precipitado, luego de ser lavado, fue resuspendido en el buffer de corrida y sembrado en el PAGE-SDS. La banda de Tg se identificó por su peso molecular relativo a standards conocidos.



Habiéndose logrado una herramienta apropiada, se estudió en primer lugar el efecto del IK sobre la síntesis de Tg, mediante un pulso de marcación con ^{35}S -met y su posterior precipitación específica con el suero hiperinmune obtenido. Luego de 72 h de tratamiento en medio 5H, 5H+IK (10^{-5} M), 6H y 6H+IK, las células fueron incubadas con ^{35}S -met en medio 5H durante 1 h. En el sobrenadante del homogenato de estas células se examinó en primer

lugar, el contenido total de marca y la radioactividad precipitable por TCA 10%. Los resultados representados en la Figura 13 indican que en las condiciones utilizadas el yoduro carece de efecto sobre la captación del aminoácido y la síntesis proteica, basal o estimulada por TSH. Por otro lado, en una tercera

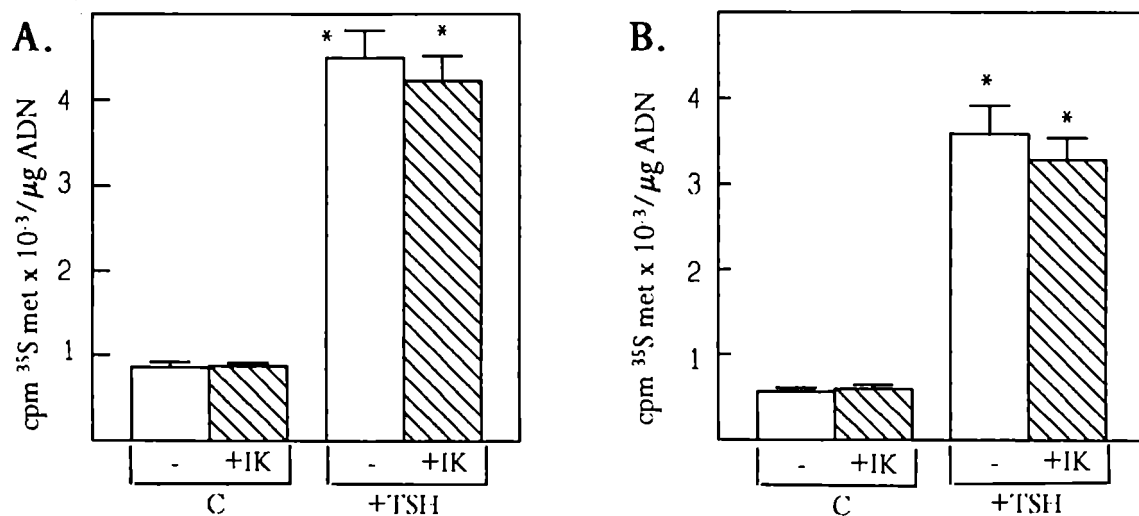


Figura 13. Efecto de TSH, IK, o TSH + IK sobre la captación y la incorporación de ^{35}S -met a proteínas en células FRTL-5.

A. Se cuantificó la radioactividad obtenida en el sobrenadante del homogenato de células tratadas durante 72 h como se indica y posteriormente expuestas a un pulso de ^{35}S -met de 1 h.

B. Efecto de los tratamientos mencionados sobre la síntesis proteica. Se cuantificó la radioactividad del sobrenadante del homogenato de las células tratadas, precipitada con TCA 10 %, como se indica en *Materiales y Métodos*.

En cada caso, se representa la media \pm DE ($n = 6$ en cada grupo) de las cpm de ^{35}S -met/ μg de ADN. * $p < 0.001$ respecto al control, ANOVA, test de Tukey.

alícuota del sobrenadante de la homogenización se evaluó el contenido de Tg marcada con ^{35}S (^{35}S -Tg) mediante la inmunoprecipitación con el suero hiperinmune obtenido. La coprecipitación inespecífica fue evaluada en una alícuota de cada sobrenadante mediante la inmunoprecipitación con el suero preinmune del mismo conejo. La radioactividad asociada a Tg se definió como la diferencia de marca precipitada con el suero hiperinmune y preinmune, en cada

una de las alícuotas ensayadas. En la Figura 14 se representan los resultados obtenidos, expresados como cuentas por minuto (cpm) asociadas específicamente a la ^{35}S -Tg inmunoprecipitada, respecto de la marca total incorporada (Figura 14. A), o bien respecto de la marca precipitable con TCA (Figura 14. B).

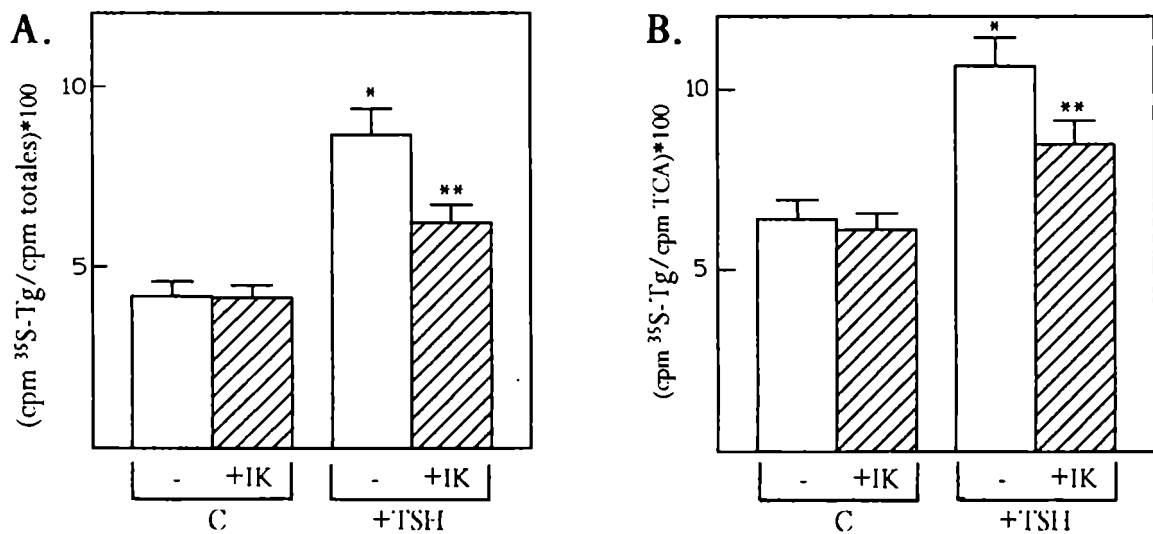


Figura 14. Efecto de la TSH, IK, o TSH + IK sobre la síntesis de Tg

A. Porcentaje de radioactividad asociada específicamente a Tg respecto a la marca total incorporada. Las células tratadas durante 72 h en las condiciones que se indican, fueron expuestas a un pulso de ^{35}S -met durante 1 h.

Los sobrenadantes de las células homogeneizadas fueron inmunoprecipitados con los sueros preinmune e hiperinmune y se cuantificó la radioactividad de los pellets, la marca total incorporada, y la radioactividad precipitable por TCA 10%. En cada caso, se representa la media \pm DE ($n = 6-8$ en cada grupo) de las (cpm de ^{35}S -met precipitadas específicamente/cpm totales o precipitables por TCA) $\times 100$. * $p < 0.001$ respecto al control, ** $p < 0.001$ respecto de TSH, ANOVA, test de Tukey.

B. Porcentaje de radioactividad asociada específicamente a Tg respecto de la marca precipitable por TCA 10 %, en células tratadas como se indica en 14.A.

Los valores obtenidos sugieren que la TSH estimula significativamente ambos parámetros. Por otro lado, el tratamiento con IK inhibe significativamente el estímulo de TSH sobre los niveles relativos de Tg sintetizada durante el pulso de marcación, sin afectar los niveles basales.

Respecto de un posible efecto tóxico del IK en las concentraciones utilizadas, estudios realizados en el mismo modelo experimental, indican que no existen cambios en la viabilidad celular cuando se utilizan concentraciones de iodo hasta 10^{-4} M, durante idénticos períodos de incubación (346). Los resultados de Becks y col (347) muestran que la inhibición por ioduro sobre la incorporación de ^3H -timidina en células FRTL-5, es reversible aún cuando se utilizan concentraciones de IK de 10^{-3} M. Por otra parte, como ya se ha mencionado, en nuestras condiciones experimentales los datos obtenidos en la incorporación de ^{35}S -met a las células y a proteínas totales indican que el iodo no altera los valores estimulados por TSH, ni los basales, lo que sugiere que la viabilidad celular se encuentra intacta luego del tratamiento. Por último, si bien las concentraciones fisiológicas de ioduro en suero oscilan entre 10^{-8} y 10^{-7} M, aproximadamente (223, 348), la ingesta terapéutica de ioduro inorgánico en el humano provoca niveles séricos de hasta 10^{-5} M sin observarse efectos tóxicos por el tratamiento (349).

De acuerdo a los resultados representados en la Figura 13. A., el tratamiento con IK no altera la incorporación de ^{35}S -met, en células tratadas durante 72 h. Si bien estos resultados concuerdan con lo demostrado por Sherwin y Tong (207), en estudios realizados en células de tiroides bovinas; los resultados obtenidos por otros autores sugieren que los mecanismos de transporte de aminoácidos se encuentran parcialmente inhibidos por la presencia del halógeno (348). Las causas de esta aparente contradicción podrían radicar en la diferencia de tiempos utilizados en el tratamiento (3 versus 72 h), en la naturaleza del aminoácido y en el modelo experimental (cultivos primarios de perro versus FRTL-5). Por otro lado, los resultados representados en la Figura 13.B., sugieren que el ioduro no afecta la síntesis de proteínas en condiciones basales ni estimuladas por TSH. Contrariamente a estos resultados, Pisarev y

Aiello (350) han sugerido que el IK inhibe significativamente la incorporación de ^3H -leucina en la fracción precipitable por TCA en cortes de tiroides bovinas. Si bien estos autores evaluaron el efecto del IK en concentraciones comparables a las utilizadas en el presente estudio, las incubaciones fueron realizadas en ausencia de TSH y a tiempos relativamente cortos (30 y 60 minutos). De acuerdo a las evidencias experimentales mencionadas, parece probable que los tratamientos cortos con el halógeno induzcan una inhibición en la síntesis proteica (350), probablemente a través de una disminución en el transporte aminoacídico (348), de manera reversible, tal que a tiempos largos (72 h) el efecto resulta indetectable.

Los resultados obtenidos en esta primera serie de experimentos sugieren que el IK posee un efecto inhibitorio sobre la síntesis de Tg estimulada por TSH, sin afectar los niveles basales. En este sentido, ha sido propuesto que el ioduro podría modular la sensibilidad del tirocito a la acción de la TSH. Esta hipótesis se encuentra avalada por numerosas observaciones experimentales. Por ejemplo, en animales hipofisoprivos tratados con una dosis diaria de tirotrofina, se ha descrito un efecto inhibitorio del ioduro en el crecimiento tiroideo, respecto de los animales tratados únicamente con TSH; sin embargo, cuando los animales no son suplementados con la dosis de TSH, el efecto del halógeno es indetectable (197, 198). Inversamente, los cuadros de bocio desarrollados por dietas pobres en iodo, son frecuentemente mayores de lo que podría anticiparse considerando la elevación modesta en los niveles plasmáticos de TSH (351).

Como se ha mencionado previamente, la biosíntesis de las hormonas tiroideas involucra, además de la síntesis de Tg, la liberación de esta proteína hacia el coloide folicular, desde donde es potencialmente recaptada y degradada por el tirocito (27). Por lo tanto, los resultados obtenidos en la

cuantificación de la Tg, sintetizada durante el pulso de marcación, reflejan la concentración de equilibrio entre la síntesis, liberación y degradación de la ^{35}S -Tg. Respecto de este último evento, resultados obtenidos mediante distintas aproximaciones experimentales indican que el efecto de altas concentraciones de IK sobre la degradación de Tg es inhibitorio o nulo. En este sentido, Bagchi y col (352) observaron un efecto inhibitorio del IK sobre la liberación de marca *in vitro*, de tiroides de ratón previamente marcadas con ^{131}I , *in vivo*. Por otro lado, en animales tratados crónicamente con exceso de yodo, ha sido descripta una acción inhibitoria en la actividad autoproteolítica tiroidea (186, 187), así como en la actividad lisosomal de dos enzimas relacionadas con la degradación de Tg, la β -glicerofosfatasa y catepsina, estimuladas por TSH (353). Finalmente, los resultados obtenidos por Penel y col (354) en un detallado estudio de los efectos de dosis moderadas de yodo sobre la función tiroidea, indican que la endocitosis de Tg se encuentra disminuída por el tratamiento crónico, sin cambios aparentes en la hidrólisis de esta proteína. De acuerdo estas evidencias, parece poco probable que el efecto autorregulatorio del yodo descripto sobre el contenido intracelular de ^{35}S -Tg sea mediado por un aumento en los niveles de su degradación.

Con el objeto de analizar el efecto del IK sobre la liberación de Tg, células FRTL-5 fueron marcadas durante un pulso de 1 h en medio 5H conteniendo el aminoácido marcado, y posteriormente sometidas a los tratamientos mencionados, durante 3 h. Las proteínas liberadas al medio de incubación fueron cuantificadas mediante la precipitación con TCA 10%, y analizadas mediante PAGE-SDS, en el que se sembró igual cantidad de marca por calle. Los resultados se representan en la Figura 15, e indican que la TSH aumenta significativamente la liberación de proteínas marcadas, mientras que el IK inhibe parcial y significativamente este parámetro (Figura 15.A.). El análisis de la

autorradiografía obtenida sugiere que el patrón de proteínas liberadas al medio no se encuentra afectada por ninguno de los tratamientos realizados (Figura 15.B.), y que la Tg en particular es liberada al medio en la misma proporción que el conjunto de proteínas exportadas, estimadas por la marca TCA precipitable.

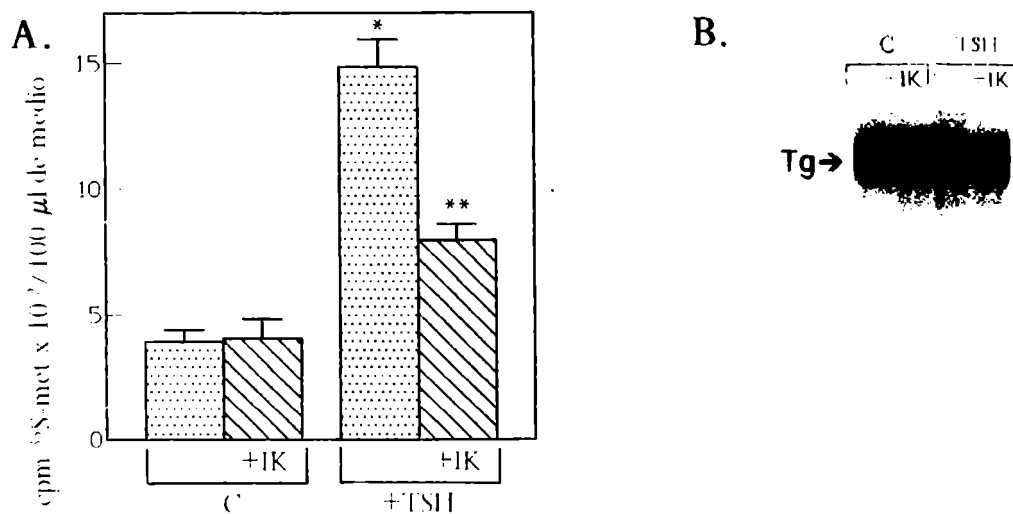


Figura 15. Efecto de TSH, IK y TSH + IK, sobre la liberación de proteínas

A. Se cuantificó la radioactividad en el precipitado de TCA 10%, de alícuotas del medio de incubación de las células expuestas a ^{35}S -met durante 1 h, y posteriormente sometidas a los tratamientos que se indican.

En cada caso, se representa la media \pm DE ($n = 5-6$ en cada grupo) de las cpm de ^{35}S -met en $100 \mu\text{l}$ de medio de incubación. * $p < 0.001$ respecto al control, ** $p < 0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey.

B. Autorradiografía de un PAGE-SDS representativo, de las proteínas liberadas al medio de incubación. Se sembraron alícuotas conteniendo la misma radioactividad.

En concordancia con trabajos de otros autores, nuestros resultados sugieren que la TSH regula positiva, aunque no específicamente, la liberación de Tg (355, 356). Si bien este resultado ha sido obtenido en condiciones agudas para la acción del yodo, la extrapolación de los resultados sugiere que la disminución de los niveles intracelulares de ^{35}S -Tg por acción del yodo (Figura 14), no sería mediada por un

aumento en su liberación. En consecuencia, los resultados obtenidos en la cuantificación del contenido intracelular de Tg marcada radioactivamente, en las células tratadas durante 72 h sugieren que la presencia de IK 10^{-5} M inhibe significativamente el estímulo de TSH sobre la síntesis de Tg. Esta inhibición sería independiente de la captación del sustrato radioactivo y de la síntesis proteica general, lo que permite suponer una acción específica sobre la síntesis de esta proteína.

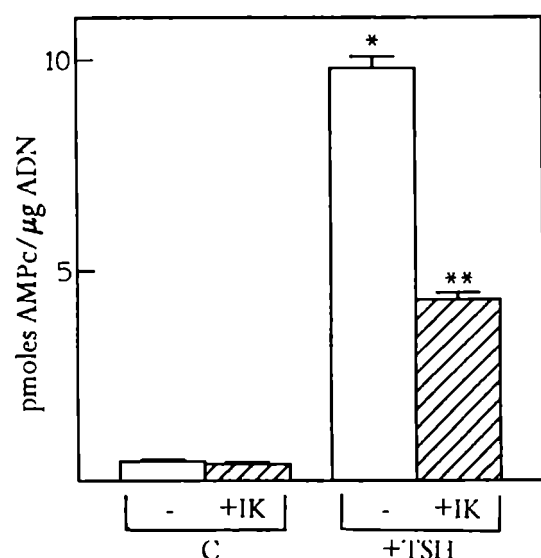


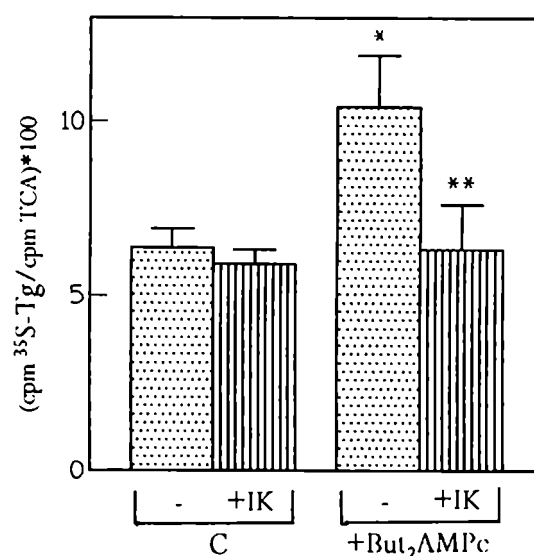
Figura 16. Efecto de TSH, IK o TSH + IK sobre el contenido de AMPc en células FRTL-5 tratadas durante 72 h como se indica. Los niveles de AMPc fueron cuantificados por RIA. Se representa la media \pm DE ($n = 6$ en cada grupo). * $p < 0.001$ respecto al control, ** $p < 0.001$ respecto de TSH, ANOVA, test de Tukey.

Como se ha mencionado en la Introducción, la TSH estimula la función tiroidea, fundamentalmente a través de la activación del sistema de señales vinculado a la adenilato ciclasa-AMPc (150, 224, 357), mecanismo que no es ajeno en particular, a la modulación de la síntesis de Tg inducida por TSH (124, 125, 358-361). Por tal motivo se evaluó, en células FRTL-5, el efecto del ioduro sobre el contenido de AMPc basal y estimulado por TSH. Los resultados representados en la Figura 16 indican que el tratamiento bajo el cual se observa

una inhibición por IK, específica en la síntesis de Tg estimulada por TSH, disminuye significativamente los niveles intracelulares del nucleótido cíclico inducidos por la TSH, si bien no altera los valores basales. Estos resultados coinciden con los obtenidos por otros autores (222-224, 348, 362, 363), y sugieren

que el efecto hallado, al menos en parte, sería causado por una disminución, en los niveles del AMPc. Para evaluar la existencia de una acción autorregulatoria distal a la formación de este nucleótido cíclico, se estudió el efecto del IK sobre la síntesis de Tg estimulada por un análogo no metabolizable del AMPc (But₂AMPc). Utilizando idéntico protocolo experimental, se obtuvieron los resultados representados en la Figura 17; los mismos sugieren que el IK inhibe la síntesis de ³⁵S-Tg relativa a la marca precipitable con TCA, también de manera

Figura 17. Efecto del IK sobre la síntesis de Tg inducida por But₂AMPc. Las células fueron tratadas durante 72 h en presencia de IK, But₂AMPc o IK + But₂AMPc, y posteriormente expuestas a ³⁵S-metionina durante 1h. En los sobrenadantes de la homogeneización celular se cuantificó la ³⁵S-Tg como se ha descrito en *Materiales y Métodos*. Se representan las medias de los valores relativos de Tg respecto de la radioactividad precipitable por TCA ± DE (n= 4-7 en cada grupo). *p<0.001 versus control, **p<0.001 versus TSH, ANOVA, test de Tukey.



distal a la formación de AMPc. Por lo tanto, el efecto autorregulatorio descrito para altas concentraciones de iodo parece ser el resultado de la inhibición de distintos eventos relacionados con el estímulo de la TSH sobre la síntesis de Tg, por un lado afecta los niveles de AMPc y por el otro, determina una respuesta disminuída a este segundo mensajero intracelular. El mecanismo autorregulatorio involucrado en estas acciones resulta aún elusivo, si bien otros efectos del iodo independientes del aumento de AMPc inducido por TSH, han sido informados sobre distintos parámetros funcionales tiroideos (198, 208, 346, 364). Por otro lado, Laurent y col (365) han sugerido que altas dosis de iodo inducen una inhibición en la formación de fosfoinosítidos (PI) estimulada por carbami-

colina y ésteres de forbol. Considerando que la TSH también estimula el aumento del Ca^{++} citosólico (84, 88, 266), la activación de la degradación de los PI y la generación de diacilglicerol (86); y teniendo en cuenta que la activación del sistema adenilato ciclasa-AMPC no alcanza a explicar todos los efectos moduladores sobre la síntesis de Tg (337), no puede descartarse que la modulación por iodo sobre este sistema de señales se encuentre involucrada en la inhibición descrita.

Con el objeto de profundizar la caracterización del efecto inhibitorio del IK sobre el estímulo de la TSH en la síntesis de Tg, se examinó el efecto de la presencia del halógeno sobre los niveles intracelulares del ARN mensajero (ARNm) de Tg, bajo la inducción de TSH. Para ello, células FRTL-5 fueron tratadas durante 72 h en medio 5H, 5H+IK (10^{-5}M), 6H y 6H+IK y se purificó el ARN total, el que fue cuantificado por la absorbancia a 260 nm. Los resultados representados en la Figura 18.A. sugieren que el yoduro no altera el contenido de ARN total en las condiciones basales, aunque revierte parcial y significativamente el estímulo de la TSH sobre este parámetro. Estos resultados concuerdan con evidencias previas obtenidas por Kleiman y col (367), quienes observaron que en cortes de tiroides bovinas, la incorporación de ^3H -Uridina a ARN se encuentra inhibida por la acción del IK, sin alterar la captación o la degradación del precursor. De acuerdo a los resultados obtenidos en la cuantificación de las proteínas sintetizadas durante el pulso de marcación con el aminoácido marcado (Figura 13.B.), esta disminución sobre el nivel de ARN total (que representa fundamentalmente el contenido de ARNr) no está asociada con una inhibición de la síntesis proteica.

Con las muestras de ARN obtenidas, según se describe en *Materiales y Métodos*, se analizó el contenido de ARNm de Tg mediante

Northern-Blot y posterior hibridización con sondas específicas para ARN de Tg de rata, y ARN ribosomal 18S (ARNr) como control de siembra. En la Figura 18.B. se muestra una autorradiografía representativa, y se indican los valores obtenidos en el análisis del film, expresados en unidades densitométricas arbitrarias (UDA) correspondientes a la banda de ARNm de Tg respecto de la de ARNr de la misma calle. Estos resultados sugieren que el contenido relativo de ARNm de Tg respecto del ARNr 18S se encuentra estimulado por TSH, si bien el tratamiento con las dosis indicadas de yoduro no afecta los valores basales, ni estimulados por TSH.

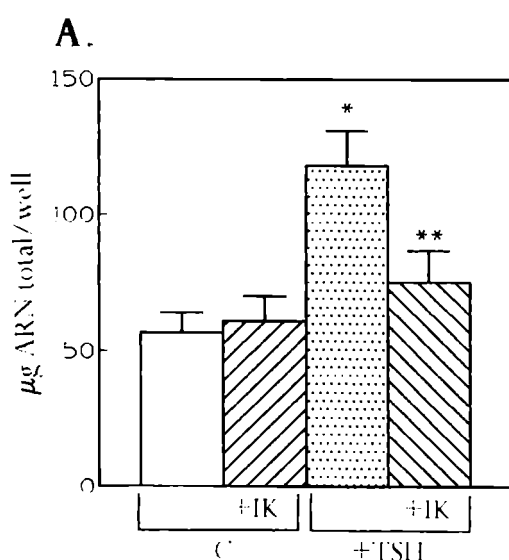
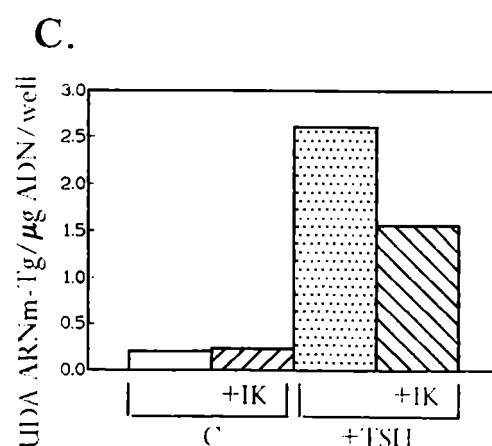
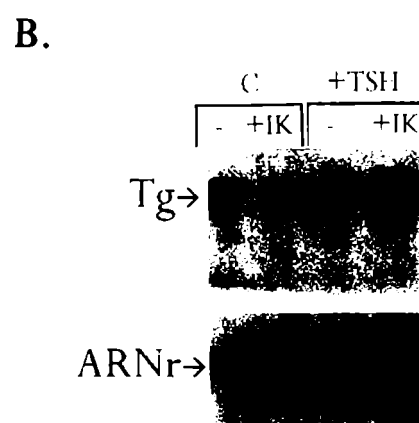


Figura 18. Efecto de IK (10 µM) sobre el contenido de ARNm de Tg en presencia o ausencia de TSH (500 µU/ml). Las células fueron tratadas durante 72 h en las condiciones que se indican. El contenido de ARN total y el ARNm de Tg se determinó según se detalla en *Materiales y Métodos*.

A. Cuantificación del contenido total de ARN por absorbancia a 260/280 nm. Se representan las medias \pm DE (n= 8-12 para cada grupo). *p<0.001 versus control, ** p< 0.01 versus TSH, ANOVA, test de Tukey.

B. Autorradiografía de un Northern Blot representativo de las muestras obtenidas como se indicó, hibridizadas con sondas específicas para Tg de rata y ARNr 18S.



C. Valores obtenidos del análisis de la autorradiografía B, expresado en unidades arbitrarias densitométricas (UDA), respecto de µg de ADN/well.

Estos resultados indican que los niveles intracelulares del ARNm de Tg son estimulados específicamente por TSH, en concordancia con evidencias previas; sin embargo el tratamiento con TSH+IK disminuye el contenido de este intermediario de la síntesis de Tg, en forma paralela al contenido de ARNr. Estudios futuros, en los que se compare el contenido de ARNm de Tg respecto del contenido de otros ARN poliadenilados, permitirán discernir la especificidad del efecto autorregulatorio descrito.

En concordancia con los resultados presentados, Scherberg y col (368) observaron que el contenido de ARNm de Tg se encuentra aumentado en tiroides de animales tratados crónicamente con PTU, si bien este cambio es paralelo al aumento del ARN total de la glándula. Por otro lado, existen evidencias indirectas, que señalan la existencia de una acción inhibitoria del iodo organificado, sobre los niveles de ARNm de Tg. Los trabajos de Lee y col (340, 341) e Isozaki y col (342) realizados en células FRTL-5, han sugerido la existencia de un efecto estimulador en el contenido de ARNm de Tg, por efecto del tratamiento con MMI, independiente de la inducción por TSH en el contenido de AMPc. A pesar de que estos resultados parecen coincidir con el efecto descrito, de acuerdo a lo sugerido por los mismos autores, no puede descartarse una acción directa de las drogas antitiroideas utilizadas.

Es sabido que la TSH aumenta la síntesis de Tg mediante el estímulo transcripcional del gen que la codifica (125, 130, 132, 146, 147, 369). Por tal motivo, se examinó si el efecto inhibitorio del iodo en los niveles de ARNm de Tg estimulados por TSH, se encuentra mediado por un cambio en la actividad transcripcional de una región del promotor del gen de Tg, que contiene secuencias que participan en el control de la expresión de este gen mediado por AMPc (130). Para ello se recurrió al siguiente protocolo experimental: células

FRTL-5 fueron transfectadas con una construcción que contiene la región codificante de un gen heterólogo (el de la enzima bacteriana cloranfenicol acetil transferasa: CAT), bajo el control transcripcional de una secuencia del promotor del gen de Tg, que abarca aproximadamente 200 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (plásmido pbTgCAT₂). Esta región promotora es suficiente para la expresión tejido-específica del gen de Tg (131, 132), y teniendo en cuenta que ciertos factores específicos del tejido tiroideo se unen a este fragmento del promotor, se ha sugerido que estos factores son activadores de la transcripción. Estudios funcionales con promotores mutados, utilizados en experimentos de cotransfección avalan esta hipótesis (131, 132, 136, 137).

Las células sometidas al protocolo de transfección que se detalla en *Materiales y Métodos*, fueron tratadas durante 48 h en medio 5H, 5H+IK, 6H y 6H+IK, con las concentraciones mencionadas. Como control de la actividad CAT, se realizó el mismo protocolo experimental en células transfectadas con el plásmido pSV₂CAT, en el cual la transcripción del gen CAT depende de un promotor cuya actividad es independiente de la modulación por TSH (la región temprana del promotor del virus SV₄₀). Los valores obtenidos en la cuantificación de actividad de la enzima CAT en las preparaciones citosólicas de células transfectadas con la construcción pbTgCAT₂, relativa a la obtenida en citosoles de células transfectadas con la construcción control (pSV₂CAT) y sometidas al mismo tratamiento, se muestran en la Figura 19. Los resultados indican que el tratamiento con yoduro no bloquea la actividad de la región promotora estudiada estimulada por TSH; por el contrario, en todos los estudios realizados se detectó un aumento de este parámetro. Sin bien no puede descartarse que regiones promotoras distales a las utilizadas en este estudio participen en una posible inhibición autorregulatoria del efecto de la TSH, estos resultados sugieren que el yoduro no inhibe el estímulo de la hormona

hipofisaria, sobre la síntesis de Tg, mediante una disminución en la transcripción de este gen, a través de la región promotora utilizada.

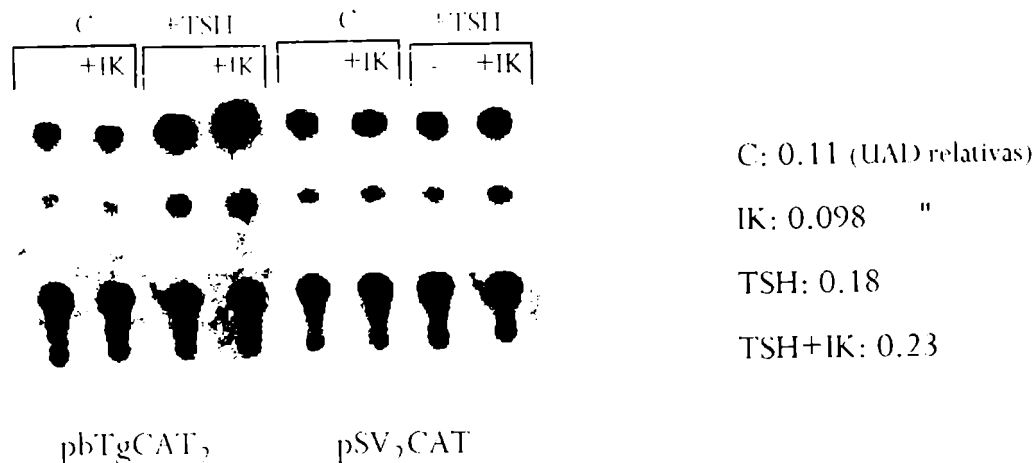


Figura 19. Efecto del IK (10 μ M) sobre la actividad transcripcional de una región del promotor del gen de Tg, en presencia o ausencia de TSH. Se muestra una autorradiografía representativa del análisis de la actividad CAT de las células transfectadas con la construcción pbTgCAT₂, y tratadas durante 48 h con los medios indicados. Se indican los valores densitométricos estandarizados respecto a la cuantificación de la actividad CAT obtenida al utilizar la construcción control.

Dado que el tratamiento con IK inhibió el nivel de ARNm de Tg sin afectar la actividad de la región promotora estudiada, se evaluó la acción del yodo sobre la estabilidad del ARNm de Tg. Con este objeto, las células FRTL-5 fueron tratadas durante 72 h en medio 5H, 5H+IK, 6H y 6H+IK. La síntesis de ARNm fue bloqueada por el agregado de Actinomicina D (Act D), en los medios correspondientes. Al cabo de 0, 3 y 6 h, las células fueron cosechadas y se determinó el contenido de ARN total y ARNm de Tg, de acuerdo a la metodología anteriormente descrita. Los resultados representados en la Figura 20.A., sugieren que el yoduro no afecta los valores relativos de ARNm de Tg/ ARN 18S basales ni estimulados por TSH, de acuerdo con los resultados obtenidos. Tampoco se encontraron diferencias en el contenido de ARN total luego de 6 h

de incubación con ActD, en ninguno de los tratamientos realizados. Sin embargo, los resultados representados en la Figura 20.B. indican que, como resultado del bloqueo de la síntesis de ARN, los niveles de degradación del ARNm de Tg no se ven afectados por la presencia de TSH o IK únicamente. Sin embargo, el tratamiento combinado de TSH+IK induce un cambio significativo en este parámetro. Estos resultados podrían indicar que el efecto inhibitorio en la síntesis de Tg cuando se encuentra presente el estímulo tirotrófico, se debe a una disminución en los niveles de ARNm de esta proteína, mediado por un aumento en el nivel de degradación de esta especie de ARNm.

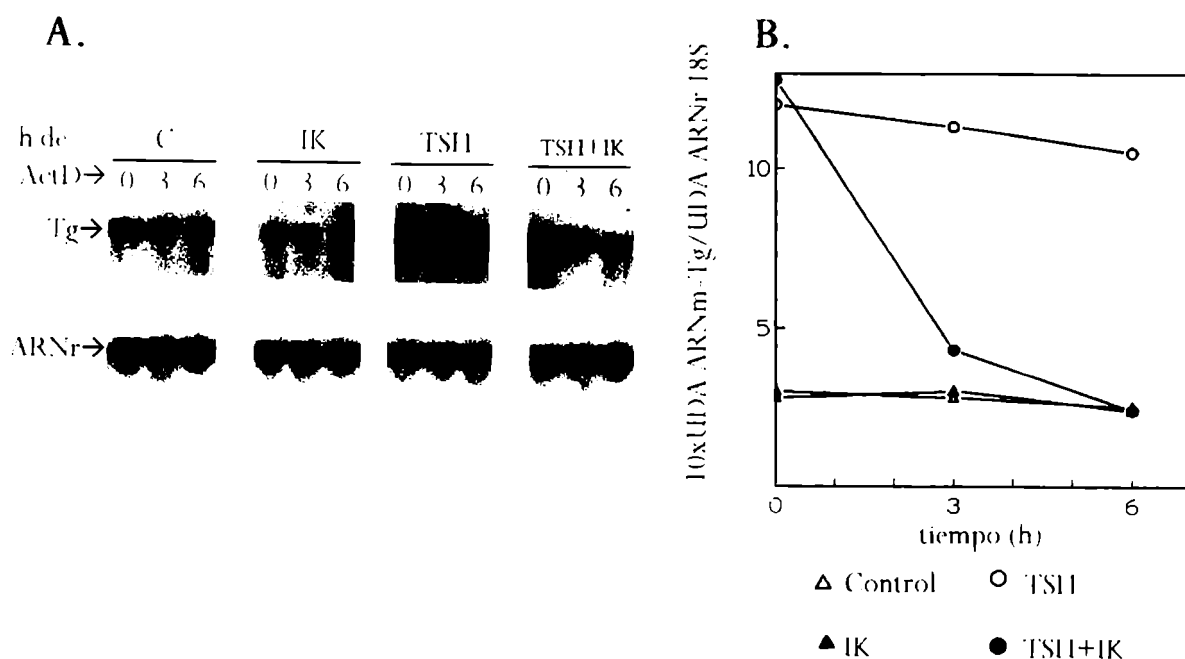


Figura 20. Efecto del IK sobre la estabilidad del ARNm de Tg, en presencia o ausencia de TSH, determinada por la variación del contenido del ARNm de Tg, en presencia de ActD durante tiempos variables. Las células fueron tratadas durante 72 h en los medios que se indican y posteriormente fueron expuestas al efecto de ActD durante 0, 3 y 6 h. Se purificó el ARN celular según se detalla en *Materiales y Métodos*.

A. Autorradiografía de un Northern Blot representativo de las muestras obtenidas como se indicó, hibridizadas con sondas específicas para Tg de rata y ARNr 18S.

B. Valores obtenidos del análisis de la autorradiografía A., expresado en unidades arbitrarias densitométricas de ARNm de Tg respecto de la banda de ARNr 18S.

1.1. 2. Actividad de TPO

Como se ha mencionado previamente, el metabolismo de iodo en la tiroides constituye un sistema ejemplar en cuanto al aprovechamiento eficiente de un elemento escaso, cuya disponibilidad es intermitente. Cuando el iodo es abundante, mediante un mecanismo adaptativo de retroalimentación negativa, reduce su propio metabolismo. El control negativo mas inmediato es la inhibición por iodo de su propia oxidación, mejor conocido como efecto "Wolff-Chaikoff" (370).

No obstante la gran cantidad de estudios realizados, el mecanismo del efecto Wolff-Chaikoff no ha sido aún totalmente elucidado. Nunez y Pommier (327) han sugerido que la peroxidasa tiroidea posee dos sitios activos: uno para el radical I^0 y otro para el grupo tirosilo. De acuerdo a esta hipótesis, un exceso de iodo podría competir para la unión de la tirosina, impidiendo la reacción de organificación. Esta hipótesis se encuentra avalada por la inhibición de la actividad de tiroperoxida purificada, por altas concentraciones de iodo (34-36), en ensayos realizados *in vitro*. Por otro lado, Corvilain y col (370) han sugerido que la generación de H_2O_2 , considerado el sustrato limitante en la reacción de oxidación del iodo (371-373), sería el evento sensible a la acción del halógeno, responsable del efecto Wolff-Chaikoff.

Con el objeto de contribuir a la caracterización de este efecto regulatorio del iodo, sobre un paso fundamental de la síntesis hormonal y el metabolismo de la Tg, se investigó el efecto del tratamiento crónico de ratas con IK, sobre la actividad de TPO en extractos de la enzima parcialmente purificada. El protocolo experimental consistió en el tratamiento crónico con el halógeno, en ratas hipofisodeprimidas por la administración crónica de T_4 , o en ratas a las que no se les realizó el suplemento con la hormona tiroidea. En el

caso de los animales tratados con T_4 , se evaluó la respuesta a dos únicas dosis de TSH, 16 y 6 h previas al sacrificio. De acuerdo a lo detallado en *Materiales y Métodos*, la actividad de TPO fue ensayada por el método de iodinación de tirosinas. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 21, e indican que la disminución de la TSH circulante, por la administración crónica de T_4 induce una inhibición significativa en la actividad enzimática de TPO, respecto de los animales control (grupo T_4 vs C, Figura 21). Por otro lado, el

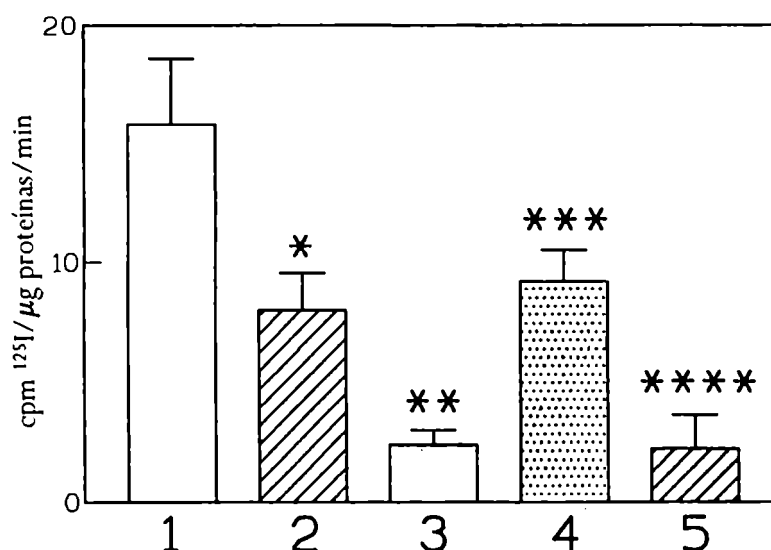


Figura 21. Efecto del IK administrado i.p. durante 5 días, sobre la actividad de TPO en tiroides de ratas con niveles endógenos de TSH disminuidos por la administración crónica de T_4 (grupos 3, 4 y 5), o en animales sin tratar con la hormona tiroidea (grupos 1 y 2). Los grupos 4 y 5 recibieron 2 dosis de TSH i.p., 16 y 6 h antes del sacrificio. Se realizaron los siguientes tratamientos:

1: Control, 2: IK, 3: T_4 , 4: T_4 +TSH, 5: T_4 +TSH+IK

La actividad de TPO se determinó según *Materiales y Métodos*. Se representan las medias \pm DE (n= 10 ratas para cada grupo), *p< 0.05, **p<0.001 versus 1, ***p< 0.05 respecto de 3, ****p<0.05 versus 4, ANOVA, test de Tukey.

ioduro inyectado en las ratas tratadas con T_4 , induce una inhibición significativa en la actividad de la enzima (grupo I vs C). Dado que el ioduro induce una disminución en la secreción de hormonas tiroideas, este efecto inhibitorio en la

actividad de TPO podría ocurrir en presencia de niveles endógenamente aumentados de TSH. Para eliminar estas diferencias, se examinó el efecto del halógeno en ratas cuya secreción hipofisaria de TSH se encuentra deprimida por la administración crónica de T_4 . En estos animales se obtuvieron resultados análogos, en respuesta a la administración aguda de TSH (grupo T_4 +TSH vs T_4 +TSH+I), si bien el yodo no afectó los valores basales (grupo T_4 +I vs T_4). De acuerdo al método utilizado en la determinación de la actividad enzimática, la totalidad de los sustratos son aportados exógenamente, de manera que el efecto inhibitorio del yodo sobre la organificación, en extractos tiroideos de animales tratados crónicamente, no estaría mediado por una disminución en la disponibilidad de H_2O_2 , como han sugerido Corvilain y col (370). Por otro lado, considerando que en el ensayo de la actividad enzimática la concentración de yodo es constante e igual para todos los extractos, y dadas las condiciones de extracción de la enzima de la fracción microsomal que permiten descartar una contaminación con altas dosis del halógeno proveniente del tratamiento *in vivo*, el mecanismo propuesto por Nunez y col (211) no parece estar involucrado en el efecto observado. Por el contrario, de acuerdo a la metodología empleada, la actividad de la TPO podría encontrarse afectada, únicamente por la cantidad de enzima activa, extraíble de la fracción microsomal. De acuerdo a esta hipótesis, el tratamiento de los animales con IK inhibe la síntesis de TPO estimulada por la TSH endógena, o en respuesta a un estímulo agudo de esta hormona.

Los resultados mencionados fueron obtenidos bajo la acción crónica de exceso del halógeno. Se ha descrito que la inhibición en la organificación del yodo es transitorio, fenómeno conocido como "de escape" del efecto Wolff-Chaikoff (174, 213), si bien nuestros resultados sugieren una inhibición persistente de este parámetro. Al respecto, se ha sugerido que el tratamiento crónico con altas dosis de yodo podría forzar la permanencia del

efecto Wolff-Chaikoff, mediante la difusión pasiva de yodo al interior de la célula tiroidea (215). En este contexto, podría sugerirse que en la acción inhibitoria aguda por yodo en la organificación estaría mediada por una disminución en la generación de agua oxigenada, o la unión competitiva del yoduro al sitio de unión del aceptor del residuo tirosina, mientras que la adaptación crónica al exceso del halógeno comprende una inhibición en el número de moléculas activas de TPO a la membrana apical, probablemente debida a una inhibición de su síntesis.

1.1.3. Crecimiento

Ha sido ampliamente estudiado el efecto de la deficiencia de yodo o de la administración crónica de sustancia bociogénicas en la hiperplasia tiroidea. Si bien estos efectos pueden explicarse en términos de un aumento de la TSH circulante, como resultado de la respuesta del servo mecanismo constituido por la interrelación entre hormonas tiroideas-hipófisis-TSH (69, 70, 150, 374), existen evidencias que indican la existencia de otros factores de origen local que afectan la proliferación tiroidea (329). En particular, numerosos estudios sugieren que el yodo modula la respuesta trófica de la TSH. Tal es el caso de Bray (202), quien observó que el crecimiento tiroideo inducido por la administración de TSH, es significativamente mayor en ratas sometidas a una dieta pobre en yodo. De acuerdo con estos resultados, se ha demostrado que el bocio puede desarrollarse aún en presencia de niveles normales de TSH circulante en zonas de baja ingesta del halógeno (375). En base a este tipo de estudios, se ha postulado que el yodo modula la sensibilidad de la tiroides a la acción bociogénica de la TSH (204), y se ha observado que esta regulación es ejercida aún en el rango de concentraciones fisiológicas de yodo (154). Sin embargo, en base a los estudios mencionados, no puede descartarse un efecto indirecto del yodo sobre el crecimiento, por ejemplo, sobre la producción de factores

parácrinos producto de la interacción del tirocito con otros sistemas celulares (329). Dadas estas consideraciones, se decidió examinar el efecto del IK sobre la proliferación celular utilizando para ello el modelo de células foliculares en cultivo (FRTL-5). Como se ha mencionado en *Materiales y Métodos*, las células fueron sembradas a baja densidad en medio 6H, y una vez adheridas, depletadas de TSH durante 72 h. Se ensayó entonces, el efecto del IK sobre el contenido de ADN, en condiciones basales o estimuladas con TSH. Los resultados representados en la Figura 22, sugieren que el halógeno interfiere significativamente con la señal trófica de la TSH, si bien en condiciones basales no se observa ningún efecto. Este resultado avala la existencia de un efecto directo del yodo sobre la sensibilidad de las células foliculares a la TSH en el crecimiento celular.

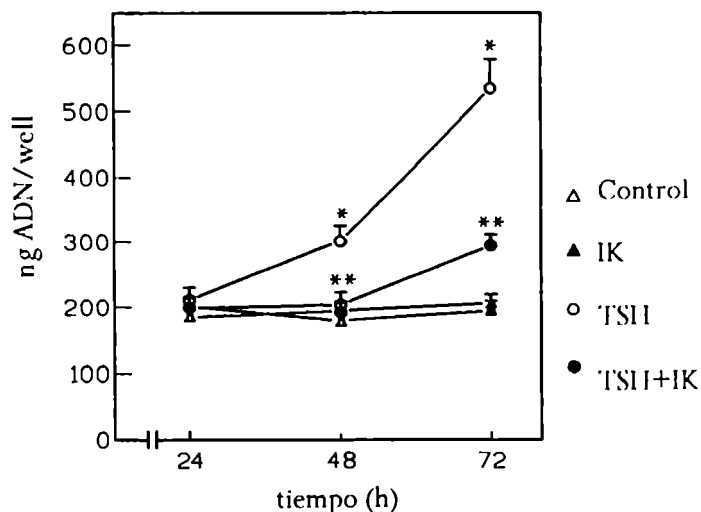


Figura 22. Efecto del IK sobre la proliferación celular cuantificada por el contenido de ADN total/well en presencia o ausencia de TSH, evaluada a las 24, 48 y 72 h. Se sembraron 100.000 células/well en medio 6H. Luego de 72 h de quiescencia, fueron sometidas a los tratamientos que se indican. Se representan las medias \pm DE ($n=6$ wells por grupo), * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.001$ versus TSH.

De acuerdo a los resultados obtenidos por otros autores, el estímulo de la TSH sobre el crecimiento tiroideo es parcialmente dependiente de

otras hormonas. En estudios realizados en distintos modelos experimentales, *in vitro*, la presencia de IGF o insulina fue necesaria para observar un óptimo efecto proliferativo de la TSH (158, 159, 160, 161, 285, 376, 377). El estímulo de la deficiencia de iodo en la inducción de bocio en la población normal, no se observa en los pigmeos, quienes poseen una deficiencia congénita de IGF-1 (329). Por otro lado, se ha sugerido que el factor TGF- β producido por las mismas células foliculares, constituye una señal negativa para la proliferación folicular (286, 287, 288, 378). Estas evidencias, en conjunto con resultados mas recientes que indican que el yoduro modula la producción de IGF-1 y de TGF- β por parte de las células tiroideas, indican que la modulación de la respuesta trófica de la TSH por el iodo responde a un complejo mecanismo, que probablemente module respuestas autócrinas y parácrinas, incluso sobre otras células vecinas.



1.2. MODULACION NORADRENERGICA DE DISTINTOS ASPECTOS DE LA FUNCION TIROIDEA

Como ha sido brevemente reseñado en la *Introducción*, la glándula tiroides, al igual que otros órganos endócrinos, se encuentra inervada fundamentalmente por tres sistemas neuronales (230): neuronas noradrenérgicas simpáticas (261, 262, 379), colinérgicas parasimpáticas (16) y peptidérgicas (380, 381, 382). En particular, ha sido demostrado que los nervios autonómicos que llegan a la tiroides hacen contacto no sólo con el tejido vascular sino también con las células foliculares (230, 242). La abundancia de neuronas noradrenérgicas que alcanzan la tiroides, que parten o bien atraviesan el GCS (383-385), podría ser un indicador de la trascendencia que posee este sistema sobre la actividad glandular. En este sentido, han sido descritos una serie de efectos sobre la función tiroidea, como resultado de la estimulación de la actividad simpática (230, 242). Por ejemplo, se ha observado que la inducción de stress agudo en ratas, aumenta transitoriamente los niveles de T_4 circulante por un mecanismo independiente del eje hipotálamo-hipofisario (386). Los trabajos de Melander y col (233, 242) realizados en ratas sometidas a la estimulación eléctrica del nervio simpático que alcanza la tiroides, avalan la existencia de efectos regulatorios de este sistema sobre la liberación de hormonas tiroideas. De acuerdo a estas evidencias y a los resultados mencionados en la *Introducción*, utilizando los modelos de deprivación simpática (GCSx crónica) en ratas (387-389), o mediante la estimulación aguda, resultante de la reacción de degeneración Walleriana de las terminales simpáticas tiroideas (GCSx aguda) (243), o en estudios farmacológicos (253, 390), se ha sugerido que el efecto de las catecolaminas en la tiroides es inhibitorio en presencia de TSH aumentada o normal, y estimulatorio

en ausencia de TSH (230, 231). A pesar de estas consideraciones, no existe consenso general acerca de la influencia noradrenérgica sobre las células tiroideas, y los antecedentes disponibles resultan contradictorios. Mediante distintas aproximaciones experimentales realizadas *in vivo* e *in vitro*, se ha demostrado que la NE y la epinefrina estimulan, inhiben, o no afectan la función tiroidea (234, 391, 392). Existen posibles explicaciones para esta contradicción en los resultados. Se ha informado la existencia de una gran variación interespecie en la frecuencia y distribución de las fibras simpáticas, en particular aquellas que alcanzan los folículos (391, 393). Por otro lado, se ha demostrado que existe una pronunciada disminución con la edad, en el número de fibras nerviosas simpáticas interfoliculares (391, 393). El tiempo de persistencia del estímulo constituye también una variable crítica, por ejemplo la inyección aguda de epinefrina en humanos aumenta la captación de ^{131}I , mientras que la infusión continua disminuye este parámetro (394).

El estudio del ritmo diario del contenido de NE en la tiroides, indica la existencia de un máximo en la mitad de la noche (23 h), un mínimo al mediodía (12 h) y un valor constante y de intensidad media entre los dos picos durante el resto del día (395). Por analogía con el ritmo de contenido de catecolaminas en la pineal y su relación con el "turnover" y síntesis de NE, se ha sugerido que éste parámetro es indicativo de la actividad simpática (395). De acuerdo a esta interpretación, los resultados sugieren que independientemente del máximo y mínimo observados, existe a lo largo del día una actividad simpática persistente, cuya consecuencia fisiológica aún no ha sido elucidada. Por otra parte, se ha demostrado que la deprivación crónica del estímulo simpático induce luego de 2-4 semanas un incremento en la respuesta bociogénica a la TSH (387-389), con aumento del índice mitótico (261, 389). Asimismo, se ha demostrado que la GCSx ipsilateral crónica amplifica el crecimiento

compensatorio inducido por la hemitiroidectomía, e incrementa la secreción T_4 del lóbulo remanente (396). El conjunto de evidencias presentadas, sugieren la existencia de efectos noradrenérgicos que resultan de la exposición persistente del órgano blanco. Hasta el presente no existen evidencias que aclaren si estos efectos son diferentes o no de los efectos noradrenérgicos caracterizados en el corto plazo. En este sentido, como ya se ha mencionado, Hays y col (394) demostraron que en humanos eutiroideos, la infusión continua de epinefrina durante una hora induce una inhibición de la captación de yodo, si bien la respuesta a una única dosis de epinefrina estimula agudamente el mismo parámetro.

Dadas estas consideraciones, se estudió el efecto de la exposición persistente a NE en la respuesta al estímulo de TSH, sobre distintos parámetros vinculados a la síntesis de hormonas tiroideas, y sobre la proliferación celular. Para ello, se utilizó como modelo experimental la línea celular FRTL-5, excepto en el estudio de la actividad de TPO, por las razones discutidas previamente. Para la estimulación noradrenérgica persistente en células, se utilizaron inhibidores de la degradación de la catecolamina en el medio de incubación (pargilina y ácido ascórbico), de manera que la vida media de la catecolamina fuera de aproximadamente 24 h (397, 398, 399). Los tratamientos se iniciaron por el agregado del medio conteniendo los agentes indicados, y se realizó un cambio del mismo cada 24 h.

1.2.1. Captación de ^{125}I

Como se ha mencionado en la Introducción, una de las principales funciones diferenciadas de las células foliculares es la de concentrar yodo (26, 119, 120, 400, 401). El transporte de este ion hacia el interior de la tiroides, constituye el paso

inicial y limitante, en la síntesis de las hormonas tiroideas (10, 24, 27). Los estudios de Weiss y col (119) han demostrado que las células FRTL-5 son capaces de concentrar hasta 30 veces el yoduro presente en el medio de cultivo, a través de un mecanismo sensible a perclorato y dependiente de Na^+ y TSH; (características similares a las descritas en otros sistemas experimentales tiroideos, como cultivos primarios o cortes de tejido (24, 119, 402)). La concentración de iodo por parte de los tirocitos organizados en folículos, depende del balance de dos mecanismos independientes: el influjo de I^- desde la membrana basolateral

hacia el interior de la célula, y su eflujo por la membrana apical hacia el coloide (31). En las células FRTL-5, a pesar de que se ha perdido la estructura polarizada, los mecanismos de influjo y eflujo mantienen las características principales, descritas para sistemas de células tiroideas organizadas (27). En particular, se encuentra ampliamente documentado el efecto inhibitorio sobre la concentración intracelular de iodo del estado estacionario, agudo y transitorio (entre los 5 y los 20 minutos) de la TSH, NE o del ionósforo de Ca^{++} : A23187, sin afectar los niveles iniciales del influjo (26, 366). Por lo tanto, se consideró de interés estudiar el efecto de la NE sobre el mecanismo concentrador de iodo, bajo las condiciones mencionadas.

Como se detalla en *Materiales y Métodos*, en esta serie de estudios las células fueron crecidas hasta confluencia en medio 6H y posterior-

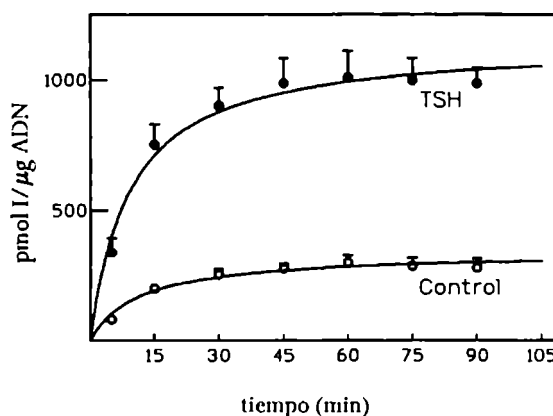


Figura 23. Curva de tiempo del pulso de $^{125}\text{I}^-$ captado en células FRTL-5, tratadas con TSH durante 72 h. Se alcanzó el estado estacionario a partir de los 45 minutos. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, ANOVA, test de Tukey.

mente depletadas de TSH durante 5 días. Para la determinación de la captación de $^{125}\text{I}^-$, luego del tratamiento que se indica en cada caso, se realizó el lavado y la incubación de las células con el isótopo radioactivo, en medio 5H. En la Figura 23 se representa la variación del contenido intracelular de ^{125}I , luego de tiempos variables de presencia del isótopo radioactivo. De acuerdo con lo informado por Marcocci (400), a partir de los 45 minutos posteriores al agregado del $^{125}\text{I}^-$, el contenido intracelular del isótopo radioactivo alcanza un valor constante, en células mantenidas en medio control o previamente tratadas durante 72 h con TSH (500 $\mu\text{U/ml}$) (Figura 23). Por este motivo, en la determinación de la captación de iodo se realizaron incubaciones de 1 h con $^{125}\text{I}^-$, de forma tal que el contenido de marca detectable en las células represente la concentración del estado estacionario. Este parámetro es el que se define como "captación". Como ya se ha mencionado, las células FRTL-5 prácticamente no organifican iodo, de manera tal que el contenido de marca en las células representa exclusivamente al halógeno libre.

Utilizando la metodología descrita, se investigó, en primer lugar, el efecto de la NE (10^{-5} M) en el estímulo de la captación de $^{125}\text{I}^-$ inducido por la TSH (500 $\mu\text{U/ml}$), luego de distintos períodos de incubación. En la Figura 24 puede observarse que la TSH induce un aumento significativo de este parámetro a partir de las 24 h, creciente aún a las 48 h de estimulación, de acuerdo con lo informado por otros autores (120, 403). La NE inhibió en forma significativa el estímulo de TSH sobre este parámetro a partir de las 24 h (12% de inhibición), aunque el máximo de inhibición (43.4%) fue alcanzado a las 48 h de coexistencia de ambas señales.

La concentración utilizada de la catecolamina es compatible con la descrita en el estudio de los efectos hallados en el corto plazo, antes mencionados (26, 404). Sin embargo, no puede descartarse la existencia de

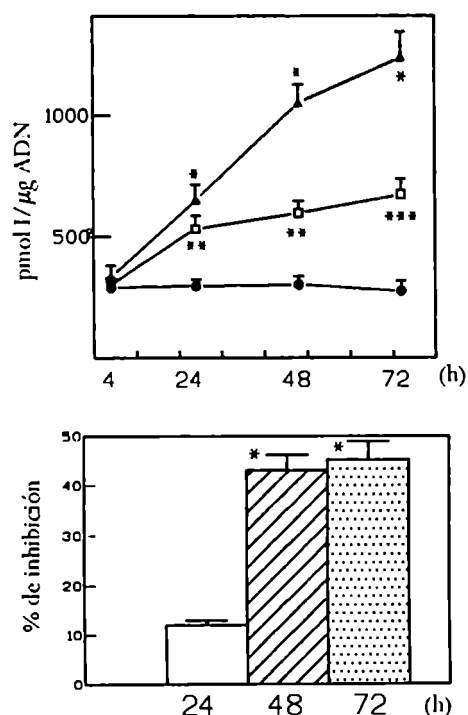
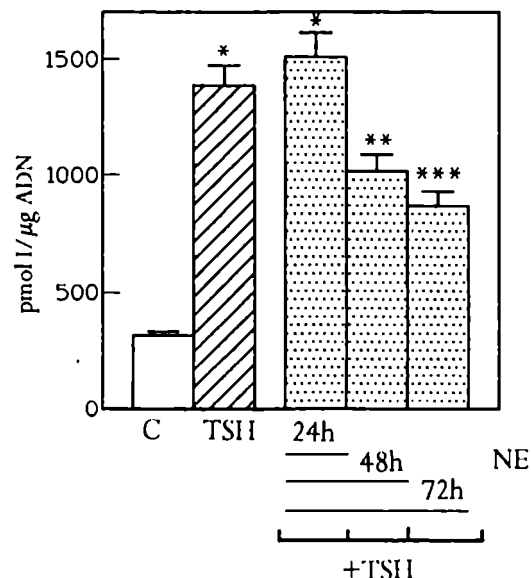


Figura 24. Curva de tiempo del efecto de TSH (en presencia o ausencia de NE), sobre la captación de $^{125}\text{I}^-$ en células FRTL-5. Las células fueron expuestas a un pulso de $^{125}\text{I}^-$ durante 1 h, luego de un estímulo de TSH (500 $\mu\text{U/ml}$) o TSH + NE (10 μM) durante tiempos variables. Se representan las medias \pm DE (n=6 por grupo) *p< 0.001, ANOVA, test de Tukey; **p<0.01, ***p<0.001 respecto al valor correspondiente de TSH, test de Student. En el panel inferior se representa el porcentaje de inhibición de NE + TSH respecto a TSH. *p<0.001 versus 24 h, ANOVA, test de Tukey.

efectos tóxicos de la NE en los tiempos de incubación realizados. Por lo tanto, se estudió la reversibilidad del efecto noradrenérgico, utilizando el siguiente protocolo experimental: se evaluó la captación de $^{125}\text{I}^-$ en células tratadas durante 72 h con TSH (500 $\mu\text{U/ml}$); y con NE (10^{-5} M) adicionada al medio de incubación al iniciarse el tratamiento y retirada del mismo a las 24 y 48 h. Como se observa en la Figura 25, la presencia del NE durante las primeras 24 h del tratamiento, no es suficiente para inhibir persistentemente la captación de $^{125}\text{I}^-$ estimulada por TSH 72 h. Sin embargo, de acuerdo a los resultados representados en Figura 24, la NE inhibe la acción de la TSH a las 24 h de tratamiento, lo que sugiere que la falta de efecto a las 72 h (Figura 25, NE 24 h) es producto de una acción reversible de la catecolamina. Este resultado podría indicar la falta de toxicidad de la NE en la concentración utilizada, y sugiere que el efecto noradrenérgico hallado no es desencadenado por una interacción aguda de la NE con la señal hipofisaria que produzca una respuesta a largo plazo. Por el contrario, la presencia de NE durante las primeras 48 h de estímulo

con TSH, inhibe significativamente la captación de $^{125}\text{I}^-$, al igual que cuando la coexistencia de señales es máxima, indicando que el estímulo noradrenérgico interfiere con eventos desencadenados por la TSH, principalmente durante las primeras 48 h.

Figura 25. Reversibilidad del efecto inhibitorio de NE sobre el estímulo de TSH en la captación de $^{125}\text{I}^-$. Las células fueron tratadas durante 72 h en presencia de TSH (500 $\mu\text{U/ml}$); la NE (10 μM) fue adicionada al comenzarse el tratamiento y retirada luego de los períodos que se indican. Posteriormente se evaluó la captación del isótopo radioactivo según se detalla en *Materiales y Métodos*. Se representan las medias \pm DE ($n=5-7$ para cada grupo) * $p < 0.001$ versus control, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey.



Con el objeto de profundizar en la caracterización del efecto noradrenérgico

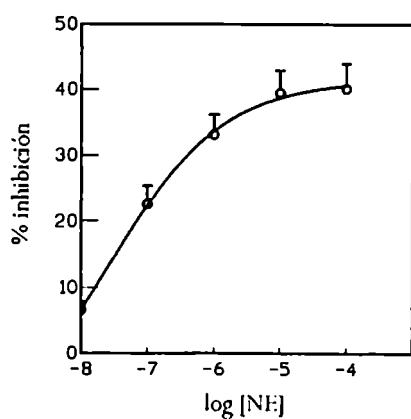


Figura 26. Curva dosis-respuesta del efecto de NE, en presencia de TSH (500 $\mu\text{U/ml}$), sobre la captación de $^{125}\text{I}^-$. Las células fueron tratadas durante 72 h con TSH o TSH + NE en concentraciones variables y luego expuestas a un pulso del radioisótopo durante 1 h. Se representan las medias \pm DE ($n= 5-8$ para cada grupo). El efecto de la NE fue significativo a partir de 0.1 μM . Se observaron diferencias significativas entre las distintas dosis, ANOVA.

descrito, en primer lugar, se evaluó la inhibición en la captación de iodo estimulada por TSH (500 $\mu\text{U/ml}$), a diferentes concentraciones de NE, luego de 72 h de tratamiento. Los resultados representados en la Figura 26 indican que existe una inhibición dosis dependiente, significativa a partir de NE 10^{-7} M hasta 10^{-4} M, con un valor máximo cuando la catecolamina se encuentra presente a partir de una concentración de 10^{-5} M.

Por otro lado, en la Figura 27 se representan los resultados obtenidos al evaluar, utilizando idénticos períodos de incubación, la acción de NE 10^{-5} M y distintas dosis de TSH en la captación de $^{125}\text{I}^-$. Se observa que la inhibición de la NE sobre este parámetro, resulta dosis dependiente respecto de la concentración de TSH, a partir de 25 $\mu\text{U/ml}$ y hasta 100 $\mu\text{U/ml}$. Asimismo, en la misma figura puede apreciarse que además de aumentar el porcentaje de inhibición, los valores de la captación de iodo en las células tratadas con TSH y NE, resultan significativamente menores cuando la concentración de TSH es de 100 $\mu\text{U/ml}$, respecto de 50 $\mu\text{U/ml}$. Esta respuesta a dosis crecientes de tirotrofina parecen indicar una potenciación del efecto de la catecolamina por TSH.

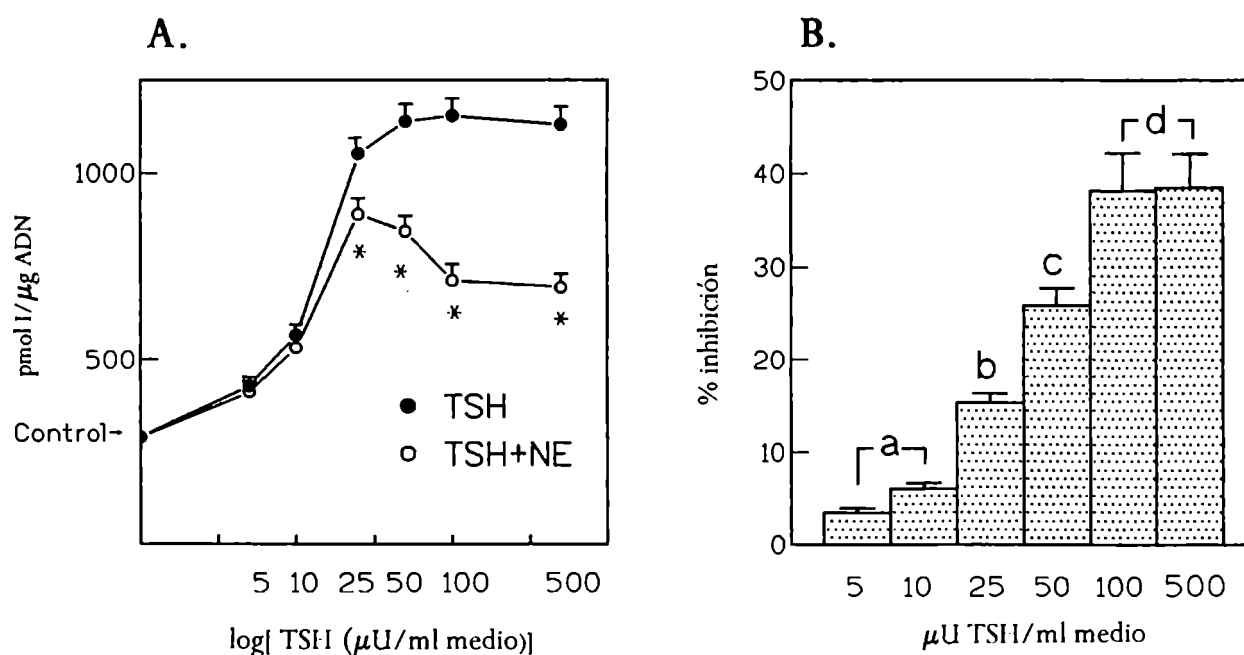


Figura 27. Curva dosis-respuesta del efecto de TSH (en presencia o ausencia de NE) sobre la captación de $^{125}\text{I}^-$ en células FRTL-5. Las células fueron tratadas durante 72 h y sometidas a un pulso con $^{125}\text{I}^-$ durante 1 h. La marca captada se expresa en pmoles de iodo/μg de ADN.

A. Se representa la media \pm DE ($n = 6$ por grupo). Cada una de las curvas dosis-respuesta fue estadísticamente significativa (ANOVA), $*p < 0.001$ entre curvas para una dada concentración de TSH, test t de Student.

B. Se representan los porcentajes de inhibición de la captación de $^{125}\text{I}^-$, en presencia de NE, para cada concentración de TSH. a, b, c, d $p < 0.001$, ANOVA, test de Tukey.

La caracterización farmacológica del receptor noradrenérgico involucrado en el efecto descrito, se realizó siguiendo el mismo protocolo experimental. Se determinó la captación de iodo radioactivo a las 72 h de tratamiento en medio control, con NE (10^{-5} M), NE+TSH (500 μ U/ml) y/o agonistas o antagonistas de receptores α_1 , α_2 y β -adrenérgicos. Los resultados obtenidos se representan en la Tabla 2, e indican que la respuesta a NE se encuentra mediada por la interacción con receptores del tipo α_1 , dado que su efecto fue reproducido por fenilefrina y bloqueado por prazosín. Los agonistas α_2 y β ,

Tabla 2. Efecto de agonistas y antagonistas adrenérgicos sobre la captación de 125 I-. Las células fueron tratadas con las drogas mencionadas durante 72 h y sometidas luego a un pulso radioisótopo durante 1 h. Se indican las medias \pm DE (n=6-10 para cada grupo). * $p<0.001$ respecto a TSH, ** $p<0.001$ respecto a TSH+NE, ANOVA, test de Tukey.

Tratamiento	(pmol I/ μ g ADN)
Control	277 \pm 18.9
TSH	1152.9 \pm 99.9
TSH+NE	583.2 \pm 45.9 *
TSH+fenilefrina	502.2 \pm 35.1 *
TSH+NE+prazosín	1088.2 \pm 89.1 **
TSH+clonidina	1125.4 \pm 97.3
TSH+isoproterenol	1134.1 \pm 89.7
TSH+NE+yohimbina	477.8 \pm 35.8
TSH+NE+propanolol	521.7 \pm 43.2

(clonidina e isoproterenol, respectivamente), carecieron de efecto en la incorporación del halógeno radioactivo estimulado por TSH, mientras que los antagonistas respectivos: yohimbina y propanolol, no bloquearon el efecto noradrenérgico. En la línea celular FRTL-5, la presencia de receptores α_1 ha sido ampliamente documentada (405-411). Asimismo, Corda y Kohn (405) demostraron que en este modelo experimental la síntesis del receptor adrenérgico de tipo α_1 se encuentra, al menos parcialmente, bajo el control positivo de la TSH. De acuerdo a estos investigadores, la TSH aumenta de 5 a 10 veces el número de receptores α_1 , de manera dosis dependiente. Estos resultados sugieren que la dependencia de la concentración y del tiempo de

exposición a TSH en el efecto noradrenérgico descrito, podría deberse a una potenciación de la respuesta de la NE mediada por el aumento del número de receptores α_1 . Como ya se ha mencionado, si bien a partir de una concentración de TSH de 50 $\mu\text{U/ml}$, la incorporación de ^{125}I se encuentra saturada, el efecto inhibitorio de la NE resultó dependiente de la dosis de TSH para concentraciones mayores de tirotrofina, sugiriendo que la saturación de la incorporación del halógeno radioactivo se produce a una concentración diferente a la de la inducción de la síntesis del receptor noradrenérgico involucrado. Por otro lado, en los trabajos de Corda y Kohn (405) el tiempo necesario para la inducción de la síntesis del receptor adrenérgico, utilizando una concentración similar de TSH (100 $\mu\text{U/ml}$) es de 20 h, alcanzando el máximo a las 48 h. Este resultado es compatible con la hipótesis de que el aumento de la respuesta noradrenérgica cuando la TSH coexiste por períodos mas prolongados con la NE en el medio de incubación (Figura 25: 24 vs 48 h de tratamiento con NE), es debido al tiempo necesario para la inducción de la síntesis del receptor adrenérgico.

Los resultados discutidos precedentemente, reflejan una acción noradrenérgica inhibitoria sobre la acumulación de ^{125}I estimulada por TSH. Sin embargo, como ya se ha mencionado, el proceso de acumulación de iodo en el lumen folicular es llevado a cabo por una serie de pasos regulados por la TSH, que incluyen la captación específica de iodo desde el torrente sanguíneo, o influjo, y la liberación hacia el coloide, o eflujo (24, 31). De esta forma, el parámetro definido como "captación", correspondiente a la concentración del estado estacionario de iodo radioactivo, resulta del balance entre ambos transportes intramembranosos. Por lo tanto, se consideró de interés discernir el efecto descrito entre cada uno de los componentes involucrados. En la Figura 28, se representan los valores obtenidos al evaluar el eflujo de ^{125}I mediante el

siguiente protocolo experimental: las células tratadas durante 72 h con TSH (500 $\mu\text{U/ml}$) y NE (10^{-5} M), y posteriormente incubadas durante 1 h en presencia del isótopo radioactivo en medio 5H, fueron lavadas rápidamente y sometidas a un cambio de medio (5H) cada 2 minutos. La radioactividad liberada se expresó como porcentaje de la marca captada en el estado estacionario (o contenido inicial). A diferencia de los efectos agudos descritos en la bibliografía (119, 412, 413), el resultado obtenido indica que el eflujo de iodo no se encuentra modificado por el tratamiento crónico con TSH, ni por la presencia de NE, luego de 72 h. Nilsson y col (31) han sugerido que

existirían dos mecanismos de inducción por TSH en la liberación de iodo en la tiroides. Por un lado, una modalidad rápida que corresponde a la translocación del I^- captado por la célula folicular hacia el coloide, a través de la membrana apical. Por otro lado, la estimulación persistente con TSH, induce una liberación de iodo que de acuerdo a estos autores, se relaciona con la pérdida de iodo del foliculo, probablemente desde los reservorios coloidales a través de los intersticios del epitelio folicular. En estudios realizados en glándulas tiroideas enteras (116, 414) se observa un aumento en la liberación de iodo radioactivo en la dirección basal, que representa una pérdida efectiva de iodo de la glándula, luego de varias horas de estimulación con TSH, cuyo mecanismo preciso y significado fisiológico aún no se ha elucidado. Por lo tanto, la liberación de iodo

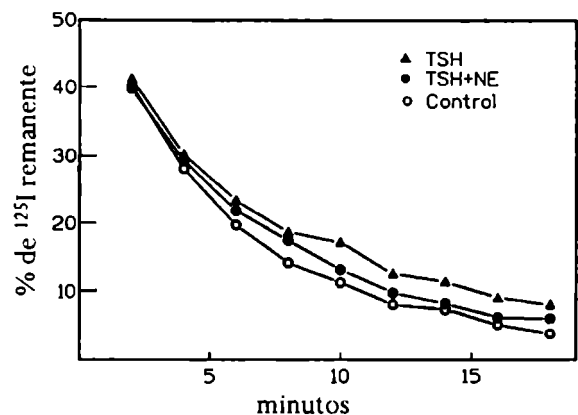


Figura 28. Efecto de NE sobre la liberación de ^{125}I al medio de incubación, en presencia de TSH. Las células fueron tratadas durante 72 h en las condiciones que se indican y posteriormente fueron incubadas durante 1 h en presencia del radioisótopo. Luego de un lavado rápido, se realizó un cambio del medio de cultivo cada 2 min. Se expresan las medias de los valores de ^{125}I remanente en las células, respecto al contenido de marca inicial.

que estaría involucrada con la modulación a corto plazo de TSH y sobre la cual se han descrito los efectos agudos de la NE, parecen corresponder al eflujo de mayor significado fisiológico, desde la célula folicular hacia el lumen, y sería el determinado en los estudios con células tiroideas en cultivo (27). Sobre este mecanismo de liberación de yodo no ha sido descrita ninguna modulación en el mediano o largo plazo, de acuerdo con los resultados presentados que indican que el eflujo de yodo de las células FRTL-5 no se encuentra afectado por la incubación con TSH, ni con TSH+NE, luego de 72 h. Por el contrario, en las células FRTL-5, se requiere un mínimo de 12-24 h de tratamiento con TSH para observar un aumento significativo en el influjo de yodo. Por consiguiente, se examinó el efecto de la NE 10^{-5} M sobre el mecanismo unidireccional de captación de yodo estimulado por TSH (500 μ U/ml). Para ello, se determinaron los parámetros cinéticos del transportador, luego de 72 h de tratamiento con los agentes mencionados, de acuerdo a la metodología detallada en *Materiales y Métodos*. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 29, e indican que el tratamiento con TSH o TSH+NE no altera la constante de

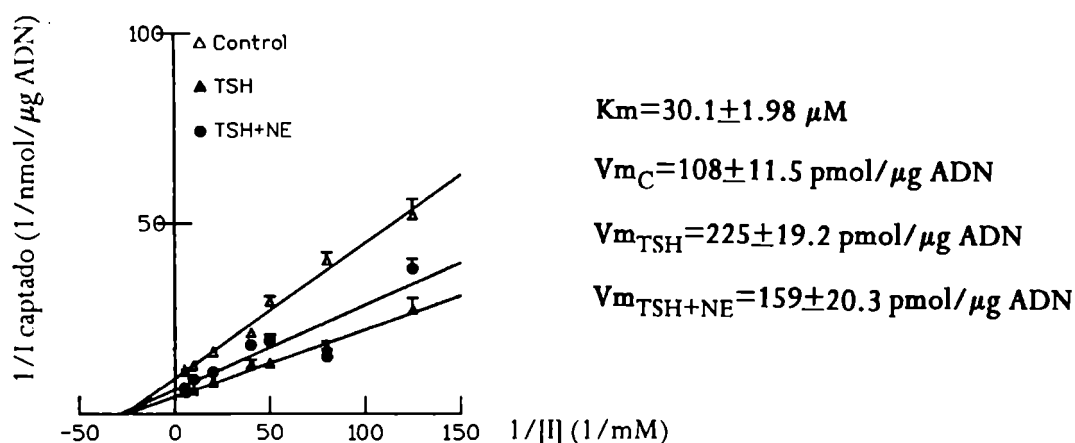


Figura 29. Determinación del efecto de NE sobre los parámetros cinéticos del transportador de I^- en células FRTL-5, en presencia o ausencia de TSH. Las células fueron tratadas durante 72 h en las condiciones que se indican. Las pendientes y ordenadas al origen se determinaron por el método de cuadrados mínimos. Los valores de K_m y V_{max} se obtuvieron por análisis de Lineweaver-Burk. Cada punto representa la media \pm DE de determinaciones por sextuplicado. Otros dos experimentos dieron constantes cinéticas esencialmente similares.

afinidad del transportador ($K_m=30.1\pm1.98 \mu\text{M}$), valor similar al informado por otros autores (119). Sin embargo, el aumento inducido por TSH en la velocidad máxima del transportador (desde $V_{mC}=108\pm11.5 \text{ pmol}/\mu\text{g ADN}$, $V_{mTSH}=225\pm19.2 \text{ pmol}/\mu\text{g ADN}$), fue inhibido parcial y significativamente por la NE ($V_{mTSH+NE}=159\pm20.3 \text{ pmol}/\mu\text{g ADN}$). Por lo tanto, se estima que el efecto noradrenérgico, inhibitorio en la captación de iodo estimulada por TSH, se encuentra mediado por una disminución parcial en el número de transportadores activos de iodo hacia el interior de la célula, si bien la alteración de la V_m por otros mecanismos no puede descartarse.

De acuerdo a numerosas evidencias experimentales, la regulación ejercida por la TSH en el aumento de la captación de iodo, se encuentra mediada por la activación del sistema adenilato ciclasa-AMPc (23, 119, 120, 415-417). En consecuencia, se estudió la acción noradrenérgica sobre la acumulación del nucleótido cíclico. En la Figura 30 se representan los valores del contenido del nucleótido cíclico, en células tratadas durante 72 h en medio control, o conteniendo NE (10^{-5} M) y/o TSH ($500 \mu\text{U/ml}$). De acuerdo con el tipo de receptor caracterizado farmacológicamente, el estímulo producido en los niveles de AMPc por el tratamiento con TSH, no se encuentra afectado por la presencia de NE en el medio de incubación. Otros autores han estudiado el efecto

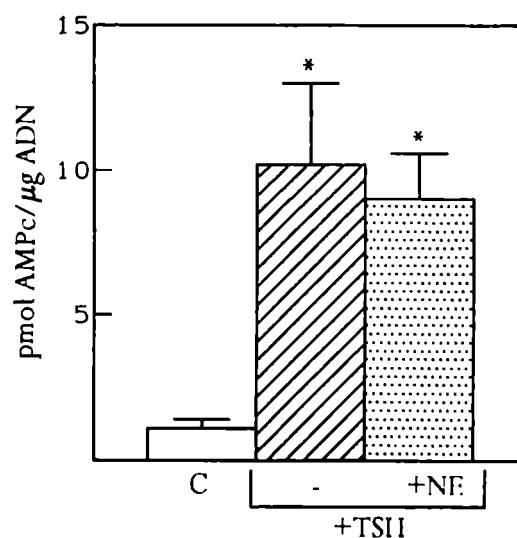


Figura 30. Efecto de NE sobre el estímulo de TSH en el contenido de AMPc. Las células fueron tratadas durante 72 h con los medios que se indican. El contenido de AMPc fue determinado por RIA. Se representan las medias \pm DE ($n=5-8$ por grupo). * $p < 0.01$ versus control, ANOVA, test de Tukey.

noradrenérgico sobre esta vía de segundos mensajeros, y los resultados son contradictorios. Si bien el tratamiento de tiroides de ratón durante 2 h con dosis similares a las utilizadas en este estudio, no altera el estímulo de la TSH sobre el contenido de AMPc, se ha informado que en células tiroideas en cultivo la NE deprime (418), o no altera (419) los niveles del nucleótido cíclico bajo la inducción de TSH, en condiciones agudas. Estos resultados, no se contraponen con lo descrito, ya que la falta de efecto noradrenérgico en este parámetro luego de tres días de tratamiento, podría ocurrir a pesar de un efecto agudo y transitorio, avalando indirectamente la hipótesis de la existencia de mecanismos diferentes vinculados al tiempo de persistencia del estímulo simpático.

El paso siguiente en la caracterización del efecto inhibitorio de la NE, fue evaluar si la catecolamina interfería con la modulación de la captación de $^{125}\text{I}^-$, ejercida por un análogo del AMPc (But_2AMPc). Los resultados representados en la Figura 31 podrían indicar que la NE interfiere con eventos desen cadenados por la TSH distales a la formación del nucleótido cíclico.

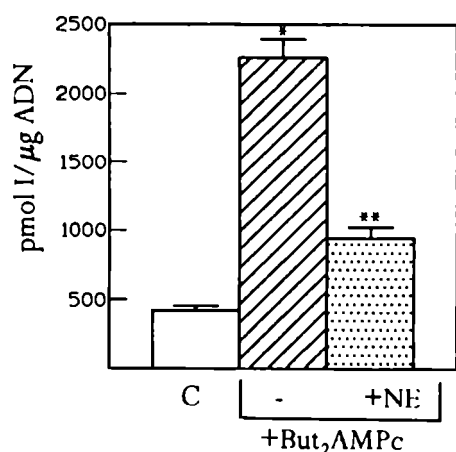


Figura 31. Efecto de NE sobre el estímulo de But_2AMPc en la captación de $^{125}\text{I}^-$. Las células fueron tratadas como se detalla en *Materiales y Métodos*. Se representan las medias \pm DE ($n=6$ por grupo). * $p<0.001$ versus control, ** $p<0.001$ versus TSH, ANOVA, test de Tukey.

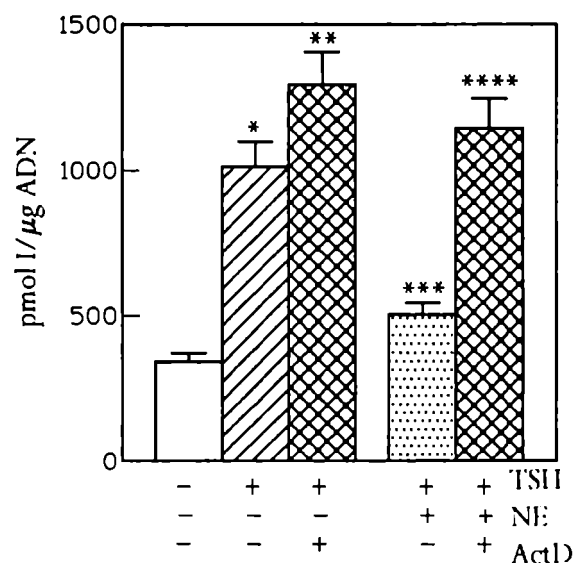
El mecanismo de influjo de I^- en células FRTL-5 ha sido objeto de numerosos estudios, de acuerdo a los cuales se ha determinado su similitud con el correspondiente a otros sistemas experimentales tiroideos (27). El transporte de iodo hacia el interior del tirocito es dependiente de Na^+ y requiere

de la integridad funcional de una $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasa}$, que intercambia el Na^+ intracelular mediante el cotransporte de I^- por K^+ extracelular (403). Como ya se ha mencionado, este mecanismo es estimulado por TSH a través del sistema adenilato ciclasa-AMPc (120). Los estudios realizados con inhibidores de la síntesis de proteínas sugieren que el estímulo del transporte de I^- hacia el interior del tirocito, es dependiente de la síntesis proteica *de novo*, requiriendo la transcripción y la traducción de proteína/s. Weiss y col (120, 403) examinaron el efecto de la TSH sobre el transporte de iodo en células FRTL-5 confirmando estas observaciones. Estos autores informaron que para observar una estimulación en el influjo de iodo, es necesaria la presencia de la TSH durante las primeras 3-5 h, si bien la estimulación se torna evidente recién a las 12-24 h, alcanzando un valor máximo a las 60-72 h. Asimismo, los estudios realizados por Weiss y col (120, 403) demostraron, que la TSH induce la síntesis de varias proteínas durante las primeras 8 h, y entre las siguientes 24 a 36 h. Por otro lado, Marcocci y col (420) han demostrado en células FRTL-5 que, si bien la ActD inhibe el estímulo de la TSH sobre la captación de iodo cuando se encuentra presente durante la fase temprana de síntesis proteica estimulada por TSH (durante las primeras 8 h); el bloqueo de la síntesis de proteínas durante la segunda fase (>24 h) estimula la captación de iodo significativamente. La caracterización del efecto tardío de la ActD sugiere un aumento en la V_m que no afecta el K_m , lo que podría indicar que la ActD induce un incremento en el número de moléculas activas del transportador presentes en la membrana de las células. Este fenómeno se denominó "superinducción". En los estudios de Marcocci y col (420), los niveles de AMPc no se vieron modificados por la ActD. Como explicación posible para este fenómeno se ha sugerido que la ActD podría bloquear la expresión de un inhibidor del transportador de iodo, cuya

síntesis sería dependiente de TSH y requeriría por lo menos 24 h de estimulación con tirotrófina.

Las evidencias experimentales discutidas sugieren que la activación del transporte de iodo mediada por TSH, involucra la síntesis de distintas proteínas, que difieren en su cinética y función. Considerando que el efecto noradrenérgico inhibitorio descrito sobre este parámetro, requiere un mínimo de 24 h para evidenciarse y es máximo a las 48 h, se evaluó la dependencia del mismo de la síntesis proteica. Para ello, células incubadas durante 48 h en medio control (5H), o conteniendo TSH y NE en las concentraciones antes mencionadas, fueron tratadas con ActD al cabo de las primeras 24 h. De acuerdo con los resultados, representados en la Figura 32, el bloqueo de la síntesis de proteínas produce la "superinducción" de la captación de iodo por la presencia de TSH, y la desaparición el efecto inhibitorio de la NE. Dado que el agregado de la ActD fue realizado luego de 24 h de comenzado el tratamiento, parece probable que la presencia persistente de la catecolamina induzca la síntesis de una/s proteína/s inhibitoria/s, en el margen de la segunda fase de inducción de síntesis proteica por TSH: 24-48 h.

Figura 32. Efecto de Act D sobre la captación de ^{125}I -, en presencia de TSH o TSH+NE. La Act D fue adicionada luego de las primeras 24 h de iniciado el correspondiente tratamiento. Al cabo de 48 hs del inicio de las incubaciones con TSH o TSH+NE, en presencia o ausencia de ActD, se evaluó la captación de ^{125}I - de acuerdo a la metodología detallada en *Materiales y Métodos*. Se representan las medias \pm DE (n=6-8 por grupo). *p<0.001 respecto del control, **p<0.01, ***p<0.001 versus TSH y ****p<0.001 respecto de TSH+NE, ANOVA, test de Tukey.



Las evidencias mencionadas indican que el tratamiento de células con TSH estimula la captación de iodo, como resultado de la activación mediada por AMPc en la biosíntesis del transportador o bien de un factor activador. De acuerdo a esta hipótesis, la falta de actividad en las células no tratadas con TSH sería causada por la baja síntesis del transportador, o del estimulador hipotético. Sin embargo, recientemente se ha observado que la acumulación de yoduro ocurre en vesículas mixtas de membranas de células FRTL-5, preparadas de células FRTL-5 sin tratar (TSH(-)) o tratadas con TSH (TSH(+)), a pesar de que las células de las cuales se extrajeron las membranas TSH(-) no fueron virtualmente capaces de concentrar iodo (435). Los autores hallaron que la activación del transportador en las membranas provenientes de TSH(-) FRTL-5 se encuentra aumentada bajo condiciones que favorecen la proteólisis, motivo por el cual han sugerido la existencia de un mecanismo de activación de los transportadores (presentes en la membrana de las células TSH(-) y (+)), que sería inducido por la TSH, y requeriría la proteólisis de un hipotético inhibidor del transportador. El conjunto de evidencias discutidas han conducido a la elaboración de la siguiente hipótesis: en condiciones basales el transportador de iodo se encontraría inhibido por la presencia de una proteína, suceptible de ser removida por proteólisis. De acuerdo a esta teoría, la TSH induciría la síntesis del transportador y de proteasas con actividad proteolítica sobre un inhibidor del transportador; así como la síntesis del inhibidor mismo con una cinética compatible con el efecto de superinducción, es decir, a partir de las 24 h de tratamiento (421). Dado que la cinética de la superinducción por ActD es compatible con la inhibición del efecto de la NE sobre la captación de iodo, existe la posibilidad de que la persistencia de la señal simpática inhiba la acumulación de iodo, por un mecanismo relacionado con el proceso proteolítico de regulación de la degradación del transportador o de la proteína inhibidora, de

acuerdo a la hipótesis mencionada. Sin embargo, la naturaleza del intermediario proteico involucrado con la respuesta inhibitoria simpática, y su relación con la proteína relacionada con el efecto de "superinducción" por TSH, deberá ser objeto de nuevos estudios.

La especificidad del efecto noradrenérgico sobre el transportador de iodo hacia el interior del tirocito, fue evaluada mediante el estudio de la acción de la NE sobre la regulación ejercida por la TSH, en otros dos sistemas de captación específica: el transportador de glucosa y el mecanismo de captación de aminoácidos AIB. Los resultados obtenidos se representan en la Figura 33.A y 33.B La presencia de la catecolamina no altera la respuesta a TSH en la actividad de estos sistemas de transporte, luego de 72 h de tratamiento.

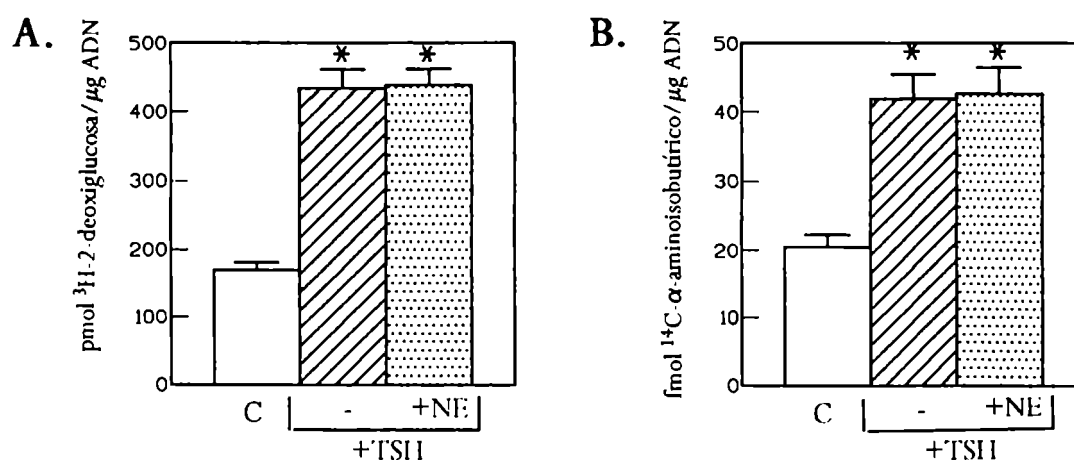


Figura 33. Efecto de NE sobre los transportadores de glucosa (A) y de aminoácidos AIB (B) en presencia de TSH.

A. El transportador de glucosa se cuantificó como la captación de ^3H -2-deoxiglucosa.

B. El transportador de aminoácidos AIB se determinó mediante la captación de ^3H - α -aminoisobutírico.

Se representan las medias \pm DE (n=8 por grupo) *p<0.001 versus control, ANOVA, test de Tukey.

1.2.2. Síntesis de Tg

Como fue discutido en la sección 1.1.1. del presente *Capítulo*, la Tg constituye el sustrato proteico, sobre el que se realiza la biosíntesis de hormonas tiroideas. Su

síntesis se encuentra bajo el control de la TSH hipofisaria, a través de la activación del sistema adenilato ciclasa-AMPC (94). La activación transcripcional ejercida por la TSH sobre el gen de Tg requiere la síntesis proteica, de manera tal que el aumento en el contenido de ARNm de Tg requiere un mínimo de 15 h para su manifestación (129).

De acuerdo a las evidencias que indican la existencia de actividad simpática sobre la tiroides, persistente a lo largo del día, se evaluó el efecto noradrenérgico sobre los niveles de ARNm de Tg, utilizando como modelo experimental la línea FRTL-5. Las células fueron tratadas durante 24 y 48 h en medio control, en presencia de TSH (500 μ U/ml), o de TSH y NE (10^{-5} M). El ARN total fue extraído y cuantificado por absorbancia a 260 nm. Como se representa en la Figura 34.A, la TSH induce un aumento en el contenido de ARN total a las 24 y 48 h de tratamiento, que no es afectado por la presencia de NE.

El contenido de ARNm de Tg fue evaluado mediante Northern Blot y posterior hibridización con la sonda complementaria marcada con 32 P. En la Figura 34.B se muestra una autorradiografía representativa, y la cuantificación densitométrica de las bandas correspondientes a la Tg, expresadas como unidades arbitrarias densitométricas, relativas al valor de la sonda control (ARNr 18S). Los resultados obtenidos sugieren que el estímulo simpático inhibe parcialmente el estímulo de TSH sobre el contenido de ARNm de Tg, a partir de las 48 h de tratamiento.

Con el objeto de evaluar la acción noradrenérgica sobre la estabilidad del mensajero de Tg, células FRTL-5 fueron sometidas a tratamientos análogos durante 48 h. La transcripción fue bloqueada por el agregado de ActD, y las células fueron cosechadas a las 3 y 6 h, para la cuantificación del contenido relativo de mensajero de Tg respecto de la sonda control. Los resultados representados en la Figura 35 sugieren que la NE no afecta la estabilidad

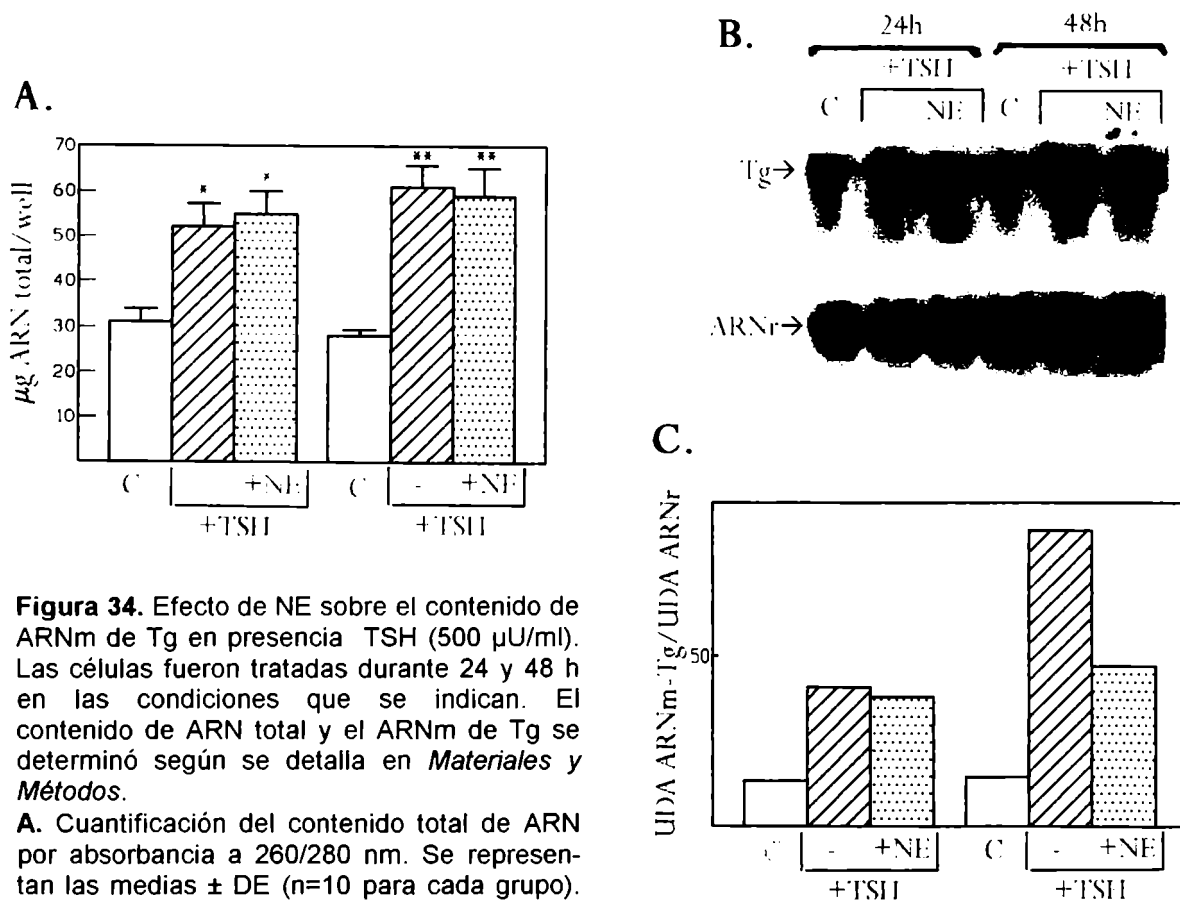


Figura 34. Efecto de NE sobre el contenido de ARNm de Tg en presencia TSH (500 μ U/ml). Las células fueron tratadas durante 24 y 48 h en las condiciones que se indican. El contenido de ARN total y el ARNm de Tg se determinó según se detalla en *Materiales y Métodos*.

A. Cuantificación del contenido total de ARN por absorbancia a 260/280 nm. Se representan las medias \pm DE ($n=10$ para cada grupo). * $p<0.001$ versus control/24 h, ** $p<0.001$ versus control/48 h, ANOVA, test de Tukey.

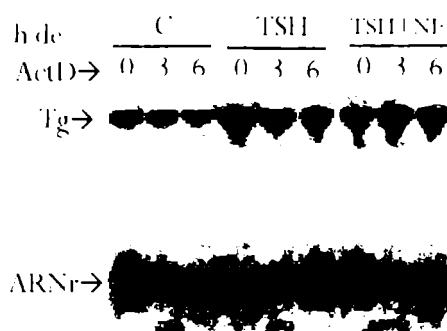
B. Autorradiografía de un Northern-Blot representativo de las muestras obtenidas como se indicó, hibridizadas con sondas específicas para Tg de rata y ARNr 18S.

C. Valores obtenidos del análisis de la autorradiografía B, expresado en unidades arbitrarias densitométricas de la banda de Tg respecto de la banda de ARNr 18 S.

del ARNm de Tg. Por consiguiente, las evidencias experimentales obtenidas permiten sugerir una acción adrenérgica inhibitoria sobre la síntesis del ARNm de Tg estimulada por TSH. De acuerdo a los resultados descriptos en el punto anterior, dado que la NE no afecta el contenido de AMPc luego de 72 h de tratamiento, podría suponerse un efecto noradrenérgico inhibitorio de la respuesta al nucleótido cíclico, mediador de la respuesta a TSH, responsable de la inhibición en la síntesis de ARNm de Tg. Si bien el contenido de ARNm no refleja necesariamente el nivel de síntesis de una proteína, la aparente diferencia de mecanismos por el cual la NE y el IK (1.1.1.) afectan la acción de la TSH

sobre la síntesis de Tg, ambos en forma distal a la formación de AMPc, podría ser un indicador de la complejidad del mecanismo de regulación de la síntesis de esta proteína.

Figura 35. Efecto de NE sobre la estabilidad del ARNm de Tg, en presencia de TSH, determinada por la variación del contenido del ARNm de Tg en presencia de ActD durante tiempos variables. Las células fueron tratadas durante 48 h en los medios que se indican y posteriormente fueron expuestas al efecto de ActD durante 0, 3 y 6 h. Se purificó el ARN total según se detalla en *Materiales y Métodos*. Se muestra una autorradiografía correspondiente a un Northern-Blot representativo de las muestras obtenidas como se indicó, hibridizadas con sondas específicas para Tg de rata y ARNr 18S.



1.2.3. Actividad de TPO

Como se discutió anteriormente, la biosíntesis de hormonas tiroideas constituye un proceso complejo que requiere, además de una fuente de agua oxigenada, tres componentes fundamentales: iodo, Tg y la enzima TPO. De acuerdo a los resultados presentados, el estímulo de la TSH sobre los niveles de dos de estos sustratos (I^- y Tg), fue inhibido por el tratamiento con NE. Dada la ineficacia del mecanismo organificador de iodo en las células FRTL-5 (343) y con el objeto de investigar el efecto del sistema simpático sobre la actividad de TPO, se recurrió al modelo de desnervación unilateral crónica en ratas. Los animales fueron sometidos a la remoción quirúrgica del GCS unilateral (GCSx), y al grupo control se les realizó una operación simulada (Sham). Como se ha descrito en la *Introducción*, la cuantificación del contenido de NE en las tiroides de animales

con GCSx, indica que a partir de los 3 días de la operación el contenido de NE en la tiroides disminuye hasta un 80% (256). Asimismo, las evidencias experimentales indican que los niveles de TSH circulantes no se encuentran modificados por la desnervación simpática unilateral (256).

Luego de 7 días de la operación, la actividad de TPO tiroidea fue evaluada mediante el método de iodinación de tirosinas. Como se detalla en *Materiales y Métodos*, la TPO fue extraída de la fracción microsomal, de las tiroides disecadas. Los resultados representados en la Figura 36, sugieren que la actividad enzimática de TPO del lóbulo desnervado es significativamente menor que la correspondiente al lóbulo contralateral intacto. Este resultado podría indicar que la actividad simpática constituye una señal positiva para la actividad de TPO, en presencia de niveles normales de TSH.

Si bien no puede descartarse que el resultado obtenido se encuentre mediado por varios factores provenientes del nervio resecado, otros autores han sugerido un efecto del mismo signo en la modulación mediada por NE de la actividad de TPO (412, 419, 422-424). Sin embargo, los estudios mencionados difieren de los aquí presentados, en primer lugar porque los estímulos utilizados fueron de 3-4 h, y en segundo lugar, la actividad enzimática de la TPO fue evaluada indirectamente, ya que se examinó el efecto de la NE sobre la liberación de la marca TCA precipitable (419), o bien el contenido de proteínas intracelulares iodinadas (412, 419), en células previamente incubadas con ^{125}I . En estos estudios no es posible discernir si los efectos noradrenérgicos hallados son específicos sobre la TPO, y/o afectan la disponibilidad de sustrato. Por otra parte, los estudios de Björkman y col (46, 425) indican que el Ca^{++} desempeña un rol fundamental en la generación de H_2O_2 , ya que en presencia de Ca^{++} y del ionóforo A23187 en el medio de incubación de células tiroideas, se produce un aumento de 10 veces en el contenido de este sustrato. Por lo tanto,

dado que, según se ha descrito, la NE incrementa los niveles de Ca^{++} citoplasmáticos a través de la interacción con los receptores α_1 (84), es posible que los efectos hallados en los estudios indirectos fueran mediados por una mayor disponibilidad de sustrato. Por el contrario, los resultado aquí presentados, obtenidos por el método de iodación de tirosinas, son una medida directa de la actividad organificadora de iodo de la TPO, ya que los sustratos son suplementados en exceso (ver *Materiales y Métodos*). Por este motivo, la disminución en la actividad de TPO en los lóbulos desnervados podría ser debida a una disminución del número de moléculas de TPO activas, probablemente por una disminución en su síntesis; aunque no puede descartarse que se produzca una modificación de la enzima tal que altere la localización intracelular, o la actividad enzimática, o alguna propiedad que modifique la eficiencia de la extracción de la fracción microsomal.

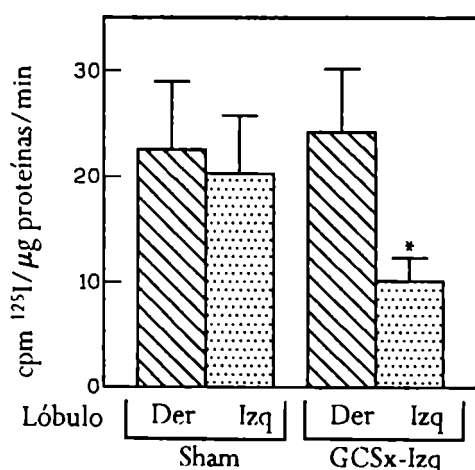


Figura 36. Efecto de la gangliectomía cervical superior unilateral crónica sobre la actividad de TPO. Los animales fueron sacrificados 7 días después de la cirugía. Se determinó la actividad de TPO según lo descrito de *Materiales y Métodos*. Se representan las medias \pm DE (n=10 ratas por grupo). *p<0.001, ANOVA, test de Tukey.

Los estudios de Ossendorp y col (142, 143) en células tiroideas en cultivo, indican que en la iodación de proteínas se utiliza como sustrato principal la Tg, y que este proceso es claramente estimulado por TSH. Sin embargo existen otras proteínas capaces de incorporar iodo. La albúmina es otro posible sustrato de la TPO, si bien la eficiencia de esta reacción es menor

que la de la Tg, y no es estimulada por TSH (142, 143). El análisis del perfil de proteínas que incorporan ^{125}I , en células tiroideas en cultivo muestra que además de las proteínas mencionadas, se encuentran presentes otras aún no caracterizadas (58, 142), cuya función específica no se conoce. Por otro lado, se han descrito cambios cualitativos en los productos de iodinación tiroideos, como resultado de la GCSx unilateral crónica. Pisarev y col (256) han descrito un incremento en el contenido de DIT y una disminución de MIT, en tiroides de ratas desnervadas crónicamente, y han sugerido que la disminución en la relación $\text{T}_3+\text{T}_4/\text{DIT}$, descrita en los lóbulos tiroideos desnervados, se debería a una falla en el acoplamiento de DIT para la formación de las hormonas tiroideas.

Por lo tanto, se consideró de interés investigar el efecto de la GCSx unilateral crónica sobre el patrón de proteínas iodinadas *in vivo*. Para ello se utilizaron ratas sometidas a GCSx unilateral, inyectadas intraperitonealmente con la dosis indicadas de ^{125}I , al séptimo día de realizada la operación. Se determinó el porcentaje de radioactividad precipitable con TCA, y se examinó el perfil de proteínas iodinadas mediante PAGE-SDS. La autorradiografía que se muestra en la Figura 37, sugiere que no existe diferencia en los sustratos proteicos de la reacción de organificación de iodo, por efecto de la gangliectomía.

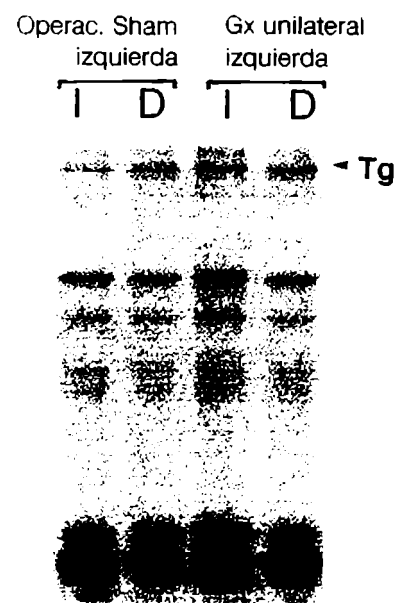


Figura 37. Efecto de la gangliectomía cervical superior unilateral crónica sobre el perfil de proteínas iodinadas *in vivo*. Los animales fueron sometidos a única dosis i.p. de $5\mu\text{Ci}$ de ^{125}I -IK, después de 7 días de la cirugía. Luego de 1 h los animales fueron sacrificados y se realizó una corrida en PAGE-SDS (6%) de una alícuota del homogenato de las tiroides, clarificado por centrifugación (10 min, 12000xg). Se sembró igual radioactividad por calle. Se muestra una autorradiografía representativa

Por otro lado, el porcentaje de marca asociada a proteínas tampoco se encuentra modificada por el tratamiento, sugiriendo que, a pesar de encontrarse disminuída, la actividad de TPO es suficiente para mantener los niveles de iodinación.

1.2.4. Crecimiento

Como ha sido discutido en 1.1.3., el principal estimulador del crecimiento tiroideo es la TSH (69, 70, 150, 374). Sin embargo, de acuerdo a lo señalado previamente, en ratas crónicamente simpatectomizadas (GCSx), se ha observado un aumento de la respuesta bociogénica a la TSH endógena o administrada exógenamente (387, 426, 389). Asimismo, el efecto positivo sobre el crecimiento glandular inducido por la desnervación crónica se evidencia también ipsilateralmente cuando se realiza una GCSx unilateral. La GCSx unilateral amplifica el crecimiento compensatorio producido por la hemitiroidectomía (396), con aumento del índice mitótico (261, 389). Dados estos antecedentes, se examinó el efecto de la NE *in vitro*, sobre el crecimiento de células FRTL-5 estimuladas con TSH. Para ello, como ya se ha mencionado previamente, las células fueron sembradas en baja densidad y tratadas durante 48 hs con medio 6H. Cuando el porcentaje de confluencia fue de aproximadamente el 20%, las células fueron depletadas de TSH durante 4 días y posteriormente sometidas a los tratamientos que se indican. En la Figura 38 se representan los valores del contenido de ADN por placa luego de distintos períodos de estimulación. Los resultados obtenidos sugieren que el tratamiento crónico con NE no altera la respuesta trófica a la TSH.

Si bien en los experimento de GCSx aguda, algunos de los efectos inhibitorios de la descarga neural sobre el funcionamiento tiroideo resultaron sensibles al tratamiento con antagonistas α y β -adrenérgicos (427), en

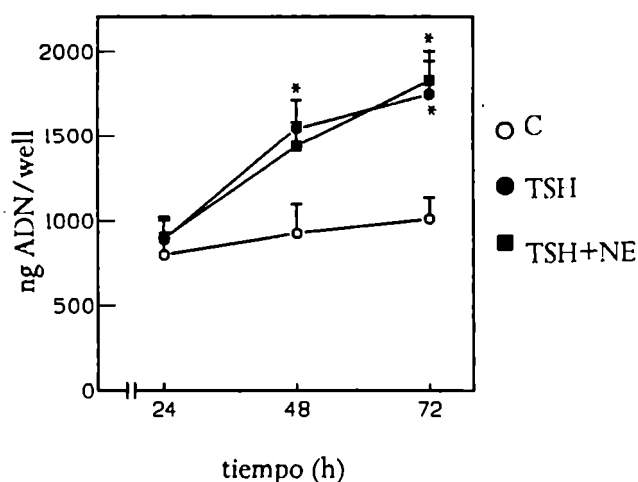


Figura 38. Efecto de la NE sobre la proliferación celular cuantificada por el contenido de ADN total/well, en presencia de TSH, evaluada a las 24, 48 y 72 h. Se sembraron 100.000 células/well en medio 6H. Luego de 48 h de quiescencia, fueron sometidas a los tratamientos que se indican. Se representan las medias \pm DE (n=6 wells por grupo), *p< 0.001 versus control.

los estudios del efecto de la GCSx crónica sobre el crecimiento, la participación específica de la NE no ha sido probada. Por lo tanto no puede descartarse que, en adición a la NE, el aporte del nervio simpático provea de otra(s) señal(es) de acción inhibitoria sobre el crecimiento tiroideo, *per se* o en combinación con la NE, entre los cuales podrían ser considerados como candidatos posibles los neuropéptidos (VIP, NPY, sustancia P) (428, 380, 381, 429). Esta hipótesis ofrece una interpretación posible para la falta de efecto de la NE. Por otra parte, la diferencia de modelos experimentales constituye también una variable de gran importancia. En primer lugar, una vez que la tiroides de rata alcanza el tamaño normal en el adulto, la presencia de TSH en el rango de concentraciones fisiológicas no altera el peso glandular, mientras que en las células FRTL-5 el mismo estímulo promueve el crecimiento (329). En segundo lugar, la inducción del crecimiento con agentes bociogénicos induce el aumento progresivo del peso tiroideo en ratas, alcanzando un plateau a los 3 meses (12 veces el volumen original). Al respecto, se ha sugerido la existencia de algún mecanismo de desensibilización al tratamiento con TSH (151, 152, 430, 431), si bien el índice mitótico del tejido se mantiene persistentemente aumentado, a pesar de no aumentar el tamaño glandular (151, 152). Al respecto se ha sugerido que el

tratamiento crónico con TSH aumenta la muerte y el recambio celular (432, 433). Estos dos efectos observados *in vivo*, parecen indicar la existencia de un mecanismo complejo de modulación del estímulo trófico de la TSH sobre la tiroides de rata, que no existe en las células en cultivo ya que el tratamiento con TSH, aún en concentraciones comparables a las fisiológicas, promueven persistentemente el crecimiento celular (329). En tercer y último lugar, existen evidencias que sugieren la existencia de subpoblaciones de tirocitos, tal que únicamente una subpoblación de células "progenitoras" serían responsables de la reposición del pool de tirocitos completamente diferenciados de proliferación limitada (434). En este caso, al establecerse el cultivo de las células FRTL-5 se podría haber realizado una selección de la población de tirocitos con alta capacidad de replicación. De acuerdo a esta hipótesis la estimulación persistente de TSH *in vivo* induce un aumento del índice mitótico, eventualmente compensado por un aumento en la muerte celular de la población no-progenitora; efecto que no sería evidente en las células FRTL-5. Tomando en cuenta estas tres evidencias experimentales, a pesar de los resultados presentados, no puede excluirse que el sistema simpático se encuentre relacionado con la modulación del crecimiento tiroideo estimulado por TSH, a pesar de no evidenciarse en el modelo experimental de las células FRTL-5.



2. ESTUDIO DE POTENCIALES MARCADORES DE DIFERENCIACION EN DIVERSAS PATOLOGIAS TIROIDEAS

Las enfermedades tiroideas constituyen, junto con la diabetes, una de las principales causas de consultas en endocrinología. De acuerdo con los estudios de Vander y col (436), la incidencia de las enfermedades nodulares tiroideas, determinada mediante el diagnóstico clínico clásico, es de aproximadamente el 5%. Sin embargo, de acuerdo a resultados obtenidos en series de autopsias o mediante la utilización de técnicas de ultrasonido, este valor alcanzaría al 30-50% del total de la población adulta; indicando que sólo una porción de pacientes con enfermedades nodulares tiroideas poseen adenomas palpables (437, 438).

Dado que la mayoría de los bocios nodulares son benignos (sólo el ~5% de los nódulos diagnosticados por palpación son malignos) (439) resulta indispensable para el correcto manejo terapéutico de los pacientes con enfermedades nodulares tiroideas, contar con métodos de diagnóstico que permitan la identificación de los tumores malignos, o que representan un riesgo potencial de conversión maligna, para su eventual remoción quirúrgica. Excepto en el caso de las enfermedades tiroideas autoinmunes o de algunos nódulos hiperfuncionantes, los estudios de función tiroidea (determinación de T_4 y TSH sérica, test de respuesta a TRH) en pacientes con bocios nodulares, suelen arrojar resultados normales o negativos. Los estudios por imágenes, como la centelleografía con ^{123}I , ^{125}I o $^{99\text{m}}\text{Te}$, permiten clasificar a los nódulos tiroideos en fríos, tibios o hiperfuncionantes. El valor diagnóstico de esta determinación, es la identificación de los nódulos fríos, ya que los adenomas funcionales

poseen mejor pronóstico. Según los datos resumidos por Ashcraft y Van Herle (440), aproximadamente el 84% de todos los tumores tiroideos estudiados revelaron la presencia de nódulos fríos, de los cuales de un 10 a un 20 % fueron malignos. De acuerdo a estos resultados, el porcentaje de nódulos calientes clasificados como malignos ascendió al 4 %, indicando que la identificación centelleográfica de los nódulos con mal pronóstico no parece ser ni muy específica, ni muy sensible. Otro estudio por imágenes, de utilización reciente, es la ultrasonografía. A pesar de la gran sensibilidad de esta técnica para la determinación de la anatomía tiroidea y la detección de lesiones aún pequeñas (441), resulta poco específica para la caracterización del grado de malignidad tumoral. Por otro lado, la realización de biopsias tiroideas ha sido ampliamente utilizada en el diagnóstico de las patologías nodulares desde hace mas de 40 años, ya que se trata de un tejido particularmente accesible. En los últimos 10 años ha cobrado gran importancia la técnica de biopsia por aspiración con aguja fina (FNA, por "Fine Needle Aspiration Biopsy"), que permite la toma de muestras para su posterior estudio citológico, con un mínimo riesgo quirúrgico (439, 442). De acuerdo a la experiencia de la Clínica Mayo de los Estados Unidos, reseñados por Gharib y col (442), el análisis citológico de las muestras obtenidas fue satisfactorio en el 85 % de los casos, mientras que en el 15 % restante no fue posible realizar el diagnóstico. Otra limitación importante de los estudios citológicos asociados a esta técnica es su incapacidad para diferenciar, en algunos casos, entre neoplasmas benignos y malignos (443). De acuerdo a Gharib y col (444), el 20 % de las muestras aspiradas han sido sospechosas, entre las cuales únicamente el 25 % resultaron malignas, de acuerdo al estudio anátomopatológico posterior a la operación.

Dadas las limitaciones de los métodos tradicionales para la determinación de la transformación, y fundamentalmente del pronóstico de

conversión maligna del crecimiento tiroideo anormal, en los últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de distintos marcadores de diferenciación tisular en diversas patologías tiroideas. El objeto de estas determinaciones es hallar marcadores específicos del proceso de transformación que permitan una clasificación mas rigurosa de los adenomas tiroideos, identificando eventuales marcadores de riesgo, y sumando evidencias que permitan una mejor comprensión de los mecanismos asociados a estos crecimientos patológicos. Con el propósito de contribuir al estudio de estos marcadores potenciales, se determinaron los niveles de ARNm de rTSH, Tg, TPO y TTF-1, en 16 muestras provenientes de la tiroidectomía parcial de pacientes con distintas enfermedades nodulares tiroideas (Tabla 3). En primer lugar, se realizó el análisis por Northern Blot, con las sondas de ADNc utilizadas en este estudio. Como se muestra en la Figura 39, los "probes" para rTSH, TPO, Tg y TTF-1, hibridizan únicamente con las muestras de ARN de tiroides (muestra número 9 de la Tabla 3), no detectándose marca en la calle correspondiente al tejido de placenta humana.

Figura 39. Especificidad de las sondas de ADNc utilizadas en el estudio de los niveles de ARNm de Tg, TPO, rTSH y TTF-1. Se realizó un Northern-Blot con 20 µg de ARN de la muestra número 9, y de placenta humana utilizada como control. Las hibridizaciones fueron realizadas según se detalla en *Materiales y Métodos*. Los pesos moleculares de las especies de ARNm detectadas en la autorradiografía, fueron evaluados por comparación con la migración de los ARN ribosomales: 18 y 28S.

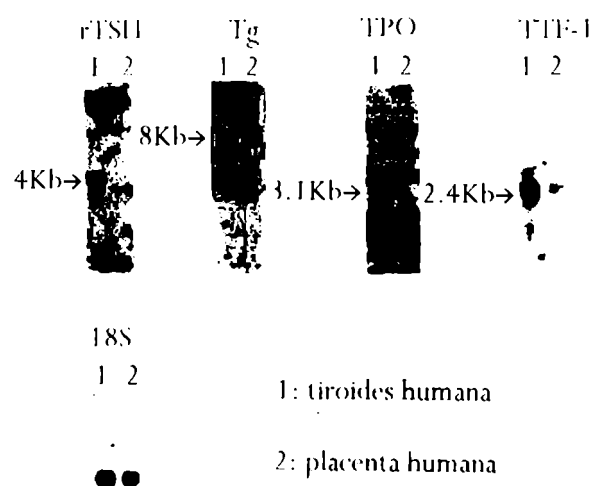


Tabla 3. Caracterización centelleográfica e histológica de 16 piezas operatorias provenientes de pacientes, cuyas edades y sexo se especifican, con diferentes crecimientos patológicos tiroideos. (BNNT: bocio nodular no-tóxico; BDT: bocio difuso tirotóxico; N: no determinado; Eut: eutiroideo; Hipo: hipotiroideo; Hiper: hipertiroideo)

	Paciente			Captación ¹²⁵ I (Centelleografía)	Histología	Tipo de Bocio	Ecografía
	Nº	Edad	Sexo				
Nódulos Fríos (NF)	1	45	M	FRIO	Adenoma Folicular	BNNT Eut	N
	2	12	M	"	"	"	Nódulo Sólido
	3	44	M	"	"	"	N
	4	25	F	"	Adenoma Macro y Micro Folicular		Nódulo
	5	46	M	"	Adenoma Folicular	"	Nódulo Mixto
	6	46	M	"	"	"	Nódulo Sólido
Nódulo de Captación (NI) Irregular	7	40	M	IRREGULAR			Nódulo c/centro liq. irreg
Nódulos Tibios (NT)	8	50	M	TIBIO	"	"	Nódulo Sólido
	9	57	M	"	"	"	Nódulo Sólido
	10	22	M	"	"	BNNT Hipo Subclínico	Nódulo Sólido
	11	42	M	"	"	BNNT Eut	Nódulo Sólido
Graves (G)	12	19	M	DIFUSO	Bocio Tirotóxico Difuso	BDT Hiper	Masa Nod .Sol.
	13	23	M	N	"	BDT	N
Hashimoto (H)	14	41	F	N	Tiroiditis	Hashimoto	N
	15	37	M	N	"	"	N
Carcinoma (CI) Indiferenciado	16	51	F	FRIO	Carcinoma Indiferenciado	-	N

A pesar de algunas bandas de menor tamaño, probablemente debidas a productos de degradación generados durante la preparación del ARN, los tamaños de las especies mayoritariamente reconocidas por las sondas son de aproximadamente 4, 3.1, 8 y 2.4 Kb, respectivamente. Estos pesos moleculares corresponden aproximadamente a los esperados, de acuerdo a las secuencias informadas de estos genes (445-450). Los resultados sugieren que las sondas son específicas para la detección de rTSH, TPO, Tg y TTF-1 humanas. Utilizando estos fragmentos de ADNc en el estudio del tejido tiroideo patológico, se

obtuvieron los resultados representados en la Figura 40. Si bien el número de muestras disponibles al momento de realizar el trabajo aquí presentado no es, obviamente, suficiente para la elaboración de conclusiones basadas en resultados estadísticos, ha sido nuestro interés fundamental aportar nuestros datos a los obtenidos por otros autores, de manera tal que permitan la evaluación de ciertas hipótesis bajo la luz de nuevas observaciones experimentales. Los valores obtenidos indican que los niveles de los mensajeros estudiados no reflejan un patrón determinado asociable a cada una de las patologías, clasificadas de acuerdo a las características anatomopatológicas o clínicas. Estos resultados se encuentran de acuerdo a los obtenidos por Hoang-Vu y col (451), quienes estudiaron los niveles de mensajeros de Tg, TPO y rTSH mediante la técnica de Northern-Blot, en pacientes con distintos tumores tiroideos, y excepto en el caso de carcinomas indiferenciados, observaron que los ARNm estudiados se encuentran expresados de manera no homogénea. Los autores han sugerido que esta variabilidad podría reflejar diferentes alteraciones en las cascadas de transducción de señales de tumores con idéntica morfología histológica, y que estos distintos patrones de expresión podrían contribuir a una clasificación diferencial de los mismos.

Como se observa en la Figura 40.A, 40.B. y 40.C, los niveles de mensajeros de Tg, TPO y rTSH de la muestra correspondiente al CI fueron indetectables, resultado que concuerda con numerosas observaciones previas (452-455). El estudio del contenido de ARNm de rTSH, TPO y Tg en carcinomas tiroideos foliculares, papilares e indiferenciados, ha llevado a postular que los niveles de estos mensajeros se encuentran en relación inversa al grado de desdiferenciación del tumor, de forma tal que el extremo de este proceso, es decir en los CI, la expresión de estos marcadores de diferenciación se encuentra ausente (454, 455). Esta hipótesis correlaciona con los datos clínicos, en cuanto a

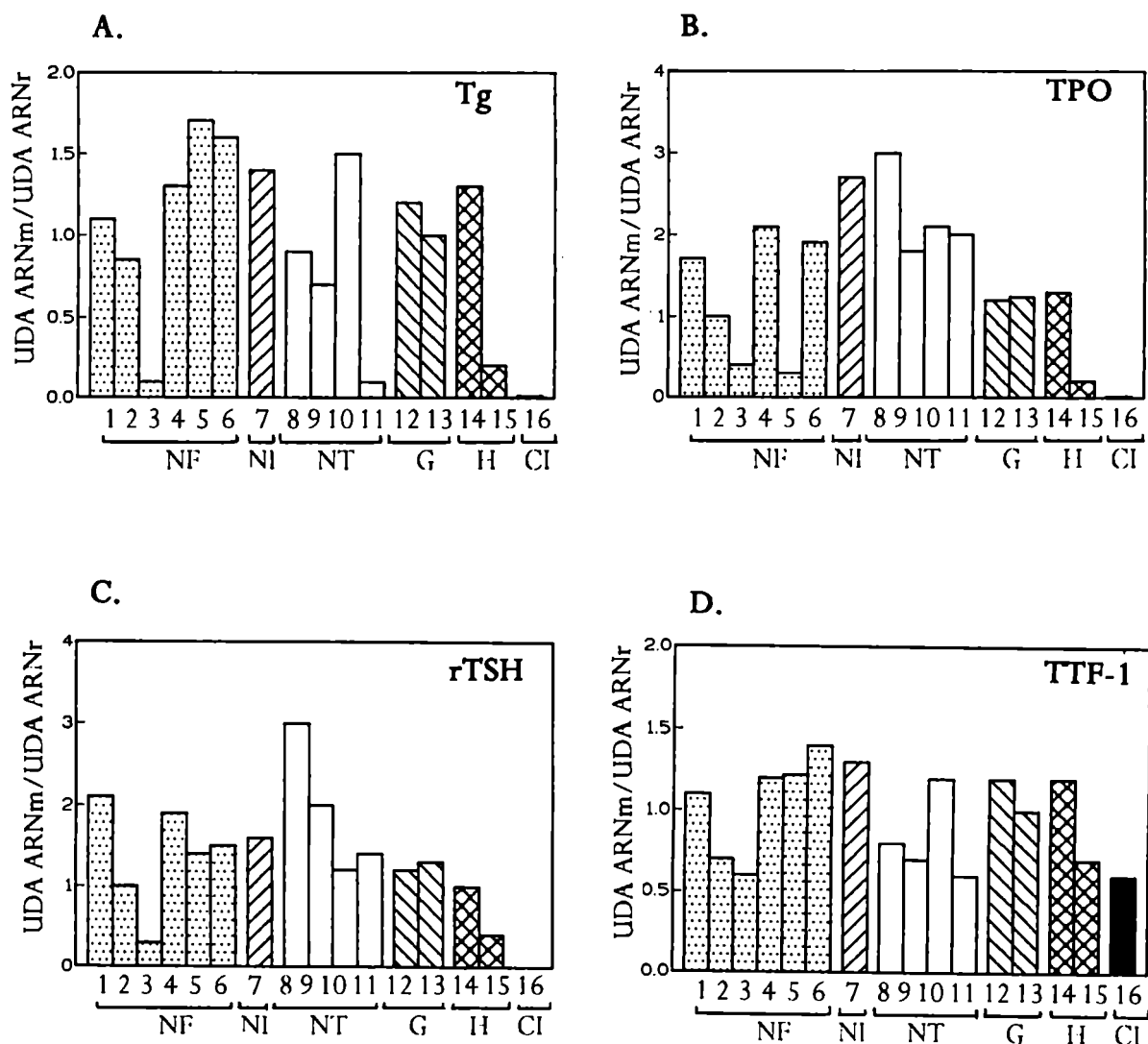


Figura 40. Determinación del contenido relativo de ARNm de cuatro genes específicos tiroideos, en las piezas operatorias tiroideas.

A. Cuantificación de ARNm de Tg

B. Cuantificación de ARNm de TPO

C. Cuantificación de ARNm de rTSH

D. Cuantificación de ARNm de TTF-1

Muestras 1-6: Nódulos Fríos.

Muestra 7: Nódulo de Captación Irregular

Muestras 8-11: Nódulos tibios

Muestras 12, 13: Graves

Muestras 14, 15: Hashimoto

Muestra 16: Carcinoma Indiferenciado

Se representan las pendientes de los valores densitométricos obtenidos en el análisis de los Dot-Blot, de las muestras sembradas en diluciones crecientes e hibridizadas con las sondas correspondientes, referidas a la cuantificación del ARNr 18S.

la producción de Tg, a la captación de yodo y a la respuesta al tratamiento supresivo con hormonas tiroideas (456-461). El objeto de este último, es reducir la secreción hipotalámica de TSH para disminuir el estímulo trófico sobre el crecimiento patológico tiroideo, y es conocida la ineffectividad del mismo en el tratamiento de carcinomas anaplásticos (462, 463).

Los factores de transcripción cumplen un papel fundamental en la determinación del fenotipo celular. La actividad de los factores de transcripción se considera, de hecho, el principal blanco de los mecanismos de regulación de la expresión genética (464). Dado que la TSH estimula, a través de la activación de la cascada del AMPc, la expresión de Tg y TPO mediante distintos mecanismos que, sin embargo, confluyen en la mediación por el factor de transcripción TTF-1, TTF-2 y Pax 8 (465), se ha evaluado la hipótesis de que alguno de estos factores sea el responsable de la regulación negativa en el proceso de dediferenciación tisular. El resultado obtenido indica que el ARNm de TTF-1 en el CI se encuentra presente y en niveles comparables al resto de las muestras estudiadas (Figura 40.D.). Avvedimento y col, realizaron una serie de estudios acerca del proceso de dediferenciación tisular tiroidea en relación a la actividad de unión del TTF-1, utilizándolo como modelo experimental una línea establecida de tiroides de rata en la cual se indujo la transformación mediante la infección con un virus portador del oncogen *Ki-ras*. La expresión del transgen en estas células indujo la pérdida de expresión de Tg, de la captación de yodo, y de la respuesta trófica a TSH. Paralelamente a la pérdida de estas funciones diferenciadas, desapareció la capacidad de unión al ADN del TTF-1, en correlación con la expresión del oncogen (466). La utilización de un alelo temperatura-sensible del mismo oncogen permitió determinar, trabajando a temperaturas no permisivas, que aún cuando se anuló la expresión de oncogen, el fenotipo transformado fue irreversible (467). En estudios posteriores, utilizando el mismo

modelo experimental, se demostró que el tratamiento con agentes desmetilantes reactivaba la expresión de Tg, con reaparición de la actividad de unión al ADN del TTF-1 (344). Basándose en estos resultados y en investigaciones posteriores, los autores han propuesto que en el proceso de dediferenciación celular tiroidea inducida por *Ki-ras*, la pérdida de la expresión de Tg se debe, tempranamente, a una inhibición en la capacidad de unión debida a una alteración del nivel de fosforilación del TTF-1 (469), mientras que, secundariamente, se produce el silenciamiento transcripcional del gen de TTF-1 debido a metilaciones inducidas por el oncogen, lo que explicaría la irreversibilidad del proceso de transformación (469, 470). Mas recientemente, Francis-Lang y col (31), han demostrado que células FRTL-5 transfectadas con *Ki-ras* pierden la expresión de Tg y TPO con ausencia de ARNm de TTF-1, mientras que en las mismas células transfectadas con *Ha-ras*, cuyos mensajeros de Tg y TPO también resultan indetectables, los niveles de ARNm de TTF-1 y su capacidad de unión al ADN se mantienen normales. Esta serie de estudios ha sido cuestionada, ya que para la inducción del fenotipo transformado se utilizaron los oncogenes mencionados, pero acompañados de secuencias virales contaminantes (471), y por la falla en la inducción de la transformación medida por *ras*, en otros modelos experimentales (472, 473). Sin embargo, los resultados de Avvedimento y col, reflejan la diversidad de mecanismos bioquímicos que conducen al desarrollo de tumores aparentemente iguales. En particular, el silenciamiento transcripcional de los genes de Tg y TPO inducido por *Ha-ras*, ocurre a pesar de encontrarse presente el factor TTF-1, de manera similar a nuestro resultado. Fabbro y col (470) han sugerido que el ARNm de TTF-1 podría ser de utilidad como marcador de diferenciación del tejido tiroideo, basándose en la detección de este mensajero en tumores tiroideos diferenciados, y en la ausencia del mismo en tres muestras de carcinomas indiferenciados humanos.

Contrariamente a lo sugerido por estos autores, a pesar de tratarse de una única muestra, el resultado obtenido sugiere descartar la utilización del ARNm de TTF-1 como marcador del fenotipo tiroideo diferenciado.

Entre las muestras clasificadas como adenomas fríos, la número 3 presenta niveles de mensajeros de Tg, TPO y rTSH disminuidos respecto del resto de los tumores con la misma caracterización centelleográfica (Figuras 40.A., 40.B. y 40.C.). De acuerdo a los resultados obtenidos en la muestra correspondiente al CI, así como a evidencias aportadas por otros autores (451, 454, 456) este patrón de expresión podría entenderse como una situación intermedia en el proceso de transformación, si bien esta hipótesis debe ser examinada bajo la luz de nuevas evidencias experimentales. Por otro lado, en dos muestras estudiadas se observa que existe una combinación variable en la expresión de TPO y Tg, a pesar de hallarse niveles medios de ARNm de rTSH. Tal es el caso de la muestra número 5, en la cual se detectan niveles elevados de ARNm de Tg, mientras que los niveles de mensajero de TPO son bajos; siendo la muestra número 11 el caso inverso. De acuerdo con este resultado, otros autores han informado que en ciertos crecimientos anormales tiroideos, se manifiesta esta aparente inactivación diferencial de los genes de Tg y TPO (454, 470). Las diferencias cinéticas, y de requerimientos para la inducción de estos dos genes (374) indican que es posible la existencia de mecanismos alternativos, no confluyentes, en el proceso de silenciamiento transcripcional. Este hecho podría reflejar la activación de oncogenes a diferentes niveles de las cascadas de señales de transducción, que conduzcan a la inactivación diferencial de la transcripción de la Tg o de la TPO, o de ambas al mismo tiempo.

Como puede apreciarse en las Figuras 40 (A., B. y C.), aquellas muestras en las que el mensajero de rTSH se encuentra disminuido,

presentan paralelamente, bajos niveles de ARNm de Tg y TPO (muestras 3, 15 y 16); no hallándose en ninguna de las muestras estudiadas la situación inversa (esto es: bajos niveles de rTSH con alto contenido de los otros dos mensajeros). El extremo de esta situación, lo representa el CI, en el cual el ARNm de rTSH no es detectable, con ausencia de mensajeros de Tg y TPO. Este resultado concuerda con las evidencias que indican que el rTSH podría ser un buen marcador de diferenciación, de acuerdo a lo señalado por Brabant y col (454) y Ohta & col (455). La expresión persistente de este gen, a lo largo de la vía de transformación neoplásica sugerida por estos autores, soñtiene el concepto de que esta proteína ubica al tirocito dentro de la red de regulación fisiológica, a través de la modulación hipotálamo-hipofisaria del crecimiento y función, de manera tal que su expresión parece ser una condición necesaria (aunque no suficiente) para la diferenciación celular del tirocito. Dado que numerosas enfermedades tiroideas cursan con niveles alterados de TSH circulante, o presentan una sensibilidad diferente a esta hormona, resulta pertinente evaluar la respuesta del parámetro sugerido como referente del grado de diferenciación del crecimiento tiroideo anormal, frente a estas probables diferencias de estímulo. Recientemente, Maenhaut y col (475) han demostrado que el tratamiento de perros con drogas antitiroideas, que promueven el aumento de TSH circulante, inducen un aumento en los mensajeros de Tg y TPO, sin modificar los niveles de ARNm de rTSH. Resultados similares fueron obtenidos utilizando células humanas en cultivo. La determinación de los niveles de ARNm de rTSH en los dos bocios tirotóxicos (Figura 40.C.) confirman estas observaciones, ya que a pesar del estímulo persistente ocasionado por la presencia de anticuerpos tiroestimulantes, los niveles del mensajero de rTSH se encuentran dentro de los valores medios de la población. Por otro lado, contrariamente a la expresión persistente del rTSH frente a variaciones del principal modulador de la

función glandular, el tratamiento *in vitro* de células tiroideas con agentes que inducen la desdiferenciación y el crecimiento, como el EGF o los ésteres de forbol, inducen una fuerte disminución en los niveles de este ARNm (475).

El parámetro funcional elegido para profundizar en la caracterización de las piezas tumorales disponibles fue la actividad de tiroperoxidasa, teniendo en cuenta por un lado, la transcendencia funcional de esta enzima, y por el otro, una serie de antecedentes que sugieren la existencia de alteraciones cualitativas de la TPO en diversas patologías tiroideas. Se ha demostrado que la actividad se encuentra incrementada en adenomas tóxicos (476-479), y en bocios difusos de la enfermedad de Graves (476-478), pero disminuida en la tiroiditis crónica de Hashimoto (477, 480, 481). La determinación de la actividad de TPO mediante el método de iodinación de tirosinas, arrojó resultados comparables a los descriptos por otros autores (Tabla 4). En los bocios tóxicos, contrariamente a lo sugerido por Valenta (477), se obtuvieron valores comparables al resto de los tumores benignos. Sin embargo, en concordancia con nuestros resultados, Takamatsu y col (482) no encontraron diferencias significativas al comparar la actividad de enzimática de TPO en adenomas

Tabla 4. Actividad de TPO determinada por el método de iodinación de tirosinas en las piezas de tiroides humanas. Se indican las medias \pm DE (n=3 para cada muestra).

	Paciente Nro	Actividad TPO (pmol I/ μ g prot 20min)
Nódulos Fríos	1	36 \pm 2.8
	2	48.2 \pm 3
	3	0
	4	10.8 \pm 2.1
	5	0
	6	36.7 \pm 1.9
Nódulo de Captación Irregular	7	7.8 \pm 0.9
Nódulos Tibios	8	15.6 \pm 1.1
	9	22.5 \pm 3
	10	50 \pm 7
	11	21.5 \pm 3.8
Graves	12	28.5 \pm 1.2
	13	16.3 \pm 0.8
Hashimoto	14	5.2 \pm 0.33
	15	0
Carcinoma Indiferenciado	16	0

benignos y bocios tirotóxicos, aún cuantificada por tres métodos diferentes. Por el contrario, la actividad de TPO en las tiroiditis de Hashimoto correlaciona con los datos de la literatura (477, 480, 481). En el caso de los nódulos fríos, únicamente en dos muestras (número 3 y 5) la actividad de TPO resultó indetectable, sugiriendo que una falla en la incorporación de iodo a la Tg podría ser la responsable de su caracterización centelleográfica. Los demás bocios no funcionales en los que la TPO fue detectable, podrían ser explicados asumiendo defectos a otro nivel del proceso de incorporación de iodo en la glándula. Al respecto, se han identificado

defectos moleculares en distintos tumores tiroideos, en el transportador de iodo (483), la Tg (484), y en el sistema generador de H_2O_2 (485).

Dumont y col (485) sugirieron que la regulación de la actividad de TPO *in vivo*, únicamente es dependiente del nivel de la expresión del gen que la codifica, y de la presencia de sustratos. Examinamos esta hipótesis evaluando la correlación entre los niveles detectados de ARNm de TPO, y las actividades medidas en cada una de las muestras estudiadas (Figura 41). De acuerdo al método experimental utilizado, los sustratos son aportados, en

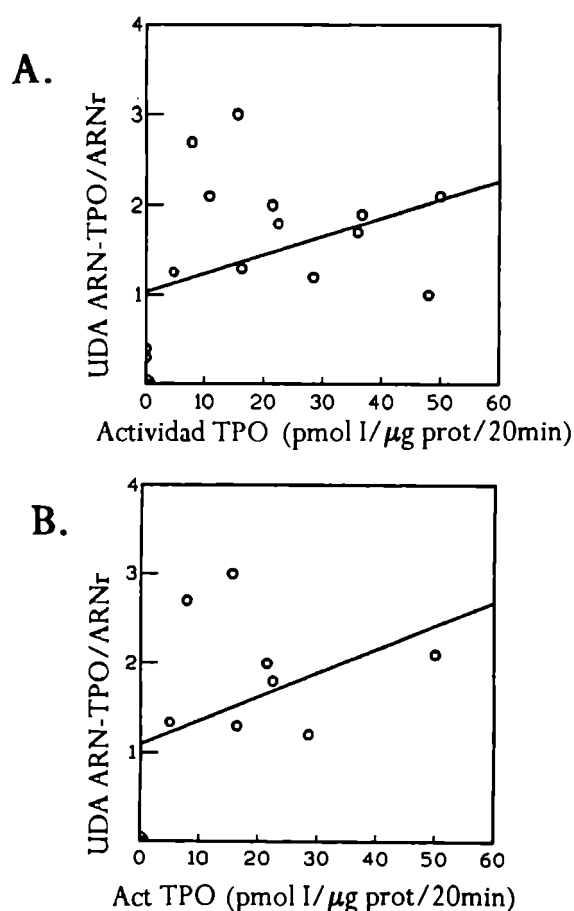


Figura 41. Falta de correlación lineal entre el contenido de ARNm de TPO respecto de la actividad enzimática. Esta última se determinó por la iodación de tirosinas como se indica en *Materiales y Métodos*. En el panel A, se graficaron todos las muestras estudiadas ($r = 0.3778$). En el panel B, se omitieron los casos correspondientes a nódulos fríos ($r = 0.03862$).

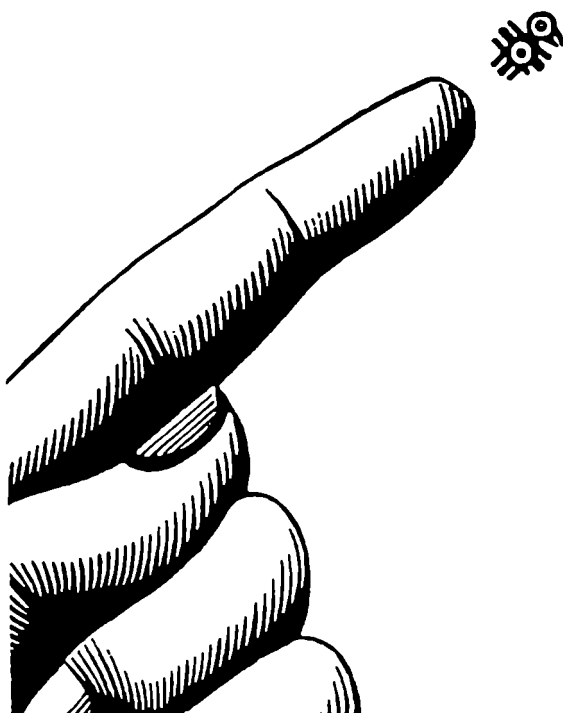
su totalidad, exógenamente, sin embargo la actividad de TPO no muestra correlación con los niveles de mensajero, ni aún luego de descartar los valores correspondientes a los nódulos fríos. Una explicación posible para este resultado es que para la determinación de la actividad enzimática, se realizó una purificación de la fracción microsomal, seguida de la extracción con Tritón x100. Se ha informado que, en ciertos casos, existirían diferencias en la distribución subcelular (486) o en la solubilidad de la enzima frente al tratamiento con detergentes (487), que podrían resultar en una subestimación de la actividad enzimática por el método utilizado. No resulta claro, sin embargo si estas alteraciones redundan en fallas funcionales en condiciones fisiológicas. Por este motivo, la utilización de este parámetro funcional en la caracterización de los distintos crecimientos patológicos tiroideos deberá ser objeto de investigaciones mas exhaustivas. Las nuevas técnicas de determinación de la actividad de esta enzima en muestras histológicas (488, 489) capaces de brindar mayor información, en cuanto a la distribución subcelular y a la magnitud de la actividad enzimática, así como los estudios de mutaciones en el gen de la TPO, contribuirán para la mejor caracterización de las alteraciones vinculadas a esta enzima en distintas patologías tiroideas.

La ventaja metodológica que representa la obtención de muestras del tejido tiroideo mediante la técnica de FNA, dado el bajo riesgo quirúrgico y los bajos costos que significa su utilización, podría ser de gran utilidad en el estudio de los eventuales marcadores de transformación, a través del seguimiento longitudinal de los crecimientos patológicos tiroideos. En este sentido, la combinación de esta técnica con la detección por PCR de marcadores de diferenciación y de tejido infiltrante, así como su utilización en la determinación de mutaciones, podría constituir una poderosa herramienta diagnóstica, conducente a la elaboración de estrategias terapéuticas mejor

diferenciadas. Sin embargo, el estudio de los eventuales marcadores de diferenciación se encuentra en sus comienzos. Los resultados presentados, junto con los de otros autores, sugieren descartar al mensajero de Tg, TPO y TTF-1, y avalan la utilización del mensajero de rTSH, como uno de los probables factores de prognosis o marcadores del crecimiento tiroideo diferenciado.



CONCLUSIONES



Los resultados presentados en la sección 1. de *Resultados y Discusión* avalan el modelo de regulación de la función tiroidea por TSH, según el cual la tirotrófina desencadena un conjunto de efectos cuya eficiencia sobre un dado parámetro de función diferenciada depende de la acción de otros moduladores:

1.1. En el marco de los fenómenos autorregulatorios tiroideos hemos examinado distintos eventos relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas y el crecimiento. Las condiciones experimentales utilizadas corresponden a un exceso del halógenos, en concentraciones tales que el transportador activo de iodo se encuentra saturado. Por lo tanto, los efectos hallados corresponderían a la acción del iodo intracelular que es incorporado en la célula por difusión pasiva (27). La falta de efectos tóxicos del iodo en las concentraciones utilizadas, tanto en los estudios *in vitro*, como *in vivo*, han sido confirmada por otros autores (346, 347).

Utilizando el modelo experimental de células de tiroides de rata (FRTL-5), hemos descripto y caracterizado parcialmente, la acción autorregulatoria del iodo sobre la síntesis de Tg, estimulada por TSH. Este efecto sería específico sobre la síntesis de esta proteína, ya que la incorporación de un sustrato aminoacídico al "pool" endógeno de proteínas sintetizadas durante un pulso de marcación, no se encuentra afectado por la presencia del halógeno. El mecanismo a través del cual se manifiesta este efecto involucra la inhibición del sistema adenilato ciclasa-AMPC, así como eventos posteriores a la formación de este segundo mensajero, en concordancia con la modulación por iodo de otras funciones reguladas por TSH (365). Sin embargo, la modulación de la actividad transcripcional del gen de Tg, a través de la inducción de la señal dependiente de AMPC, no parece estar involucrada en la inhibición ejercida por el yoduro. Por otro lado, los niveles del mensajero de Tg estimulados por TSH se

encuentran disminuídos por efecto del halógeno a través del aumento de la degradación de esta especie de ARNm.

El significado fisiológico de la inhibición de la síntesis de Tg por altas concentraciones de iodo, podría basarse en un efecto tendiente a disminuir la síntesis de uno de los sustratos de la síntesis hormonal en respuesta a la TSH hipofisaria, cuando la disponibilidad de iodo se mantiene elevada durante un tiempo prolongado, tal que la acumulación de iodo organificado en el lumen sea máxima. Dado que los efectos de exceso del halógeno son generalmente de signo contrario a las obtenidas en condiciones de déficit, a partir del resultado obtenido podría suponerse que en condiciones fisiológicas, una disminución en la ingesta de iodo determinaría un aumento de la sensibilidad a TSH en relación a la síntesis de Tg, como parte de un mecanismo de retroalimentación positiva tendiente a maximizar el aprovechamiento del halógeno. Los trabajos mencionados de Isozaki y col (342), acerca del efecto estimulador del MMI en la acumulación de ARNm de Tg, en células FRTL-5, avalan esta hipótesis. Por otro lado, la especificidad del efecto hallado en la síntesis de Tg, independiente del nivel de síntesis proteica general, constituye una de las pocas evidencias de efectos no pleiotrópicos del halógeno.

Otra etapa vinculada a la síntesis de hormonas tiroideas que se ha examinado, es la actividad de TPO estimulada por TSH. Para ello se ha utilizado como modelo experimental el tratamiento crónico en animales, ya que la actividad de esta enzima en la línea celular FRTL-5 no es detectable con la metodología disponible. Los resultados obtenidos permiten sugerir un efecto inhibitorio de la acción de la TSH, por el tratamiento con iodo, sobre el número de moléculas de enzima activas asociada a membrana. Esto constituye una explicación alternativa para el mecanismo de adaptación a la disponibilidad de iodo, cuando la ingesta elevada del halógeno es prolongada. Las similitudes en

acuerdo con numerosas evidencias experimentales obtenidas con posterioridad al estudio realizado en nuestro laboratorio, un exceso de IK inhibe la proliferación estimulada por TSH, en la línea celular FRTL-5.

Dado el requerimiento de la tiroides por el yodo, un elemento traza cuya disponibilidad para el organismo puede diferir ampliamente de tiempo en tiempo y de lugar en lugar, la tiroides posee una serie de características distintivas, que regulan esta dependencia de la disponibilidad de sustrato para la síntesis hormonal. En primer lugar, las hormonas tiroideas son sintetizadas en una proteína matriz, la Tg, capaz de aceptar gran cantidad de yodo. Por otro lado, la arquitectura folicular de la tiroides provee un sitio para el almacenamiento de grandes cantidades de hormonas tiroideas unidas a la Tg. Para la liberación hormonal, el tirocito capta Tg del lumen folicular y la degrada enzimáticamente. Las hormonas tiroideas, una vez secretadas a la circulación, se encuentran fuertemente unidas a proteínas transportadoras, de manera tal que su cinética de remoción del plasma es lenta y su acceso a los tejidos es limitado. El producto mas abundante de la secreción hormonal tiroidea es la T_4 , que alcanza los tejidos lentamente, donde adquiere la actividad biológica por conversión enzimática a T_3 . Estos mecanismos permiten un lento y continuo aporte de hormonas tiroideas a los tejidos, a pesar de las variaciones en la disponibilidad de yodo debidos a la ingesta, y de los cambios agudos en la secreción hormonal hacia el torrente sanguíneo en respuesta a los diferentes moduladores del funcionamiento tiroideo. En este contexto, los efectos autorregulatorios de la función tiroidea ejercidos por el yodo, constituyen un mecanismo adicional de la tiroides tendientes a contrarrestar los cambios bruscos en la ingesta del halógeno. El conjunto de resultados presentados se suma a la amplia gama de procesos regulados por el yodo, que probablemente se relacionen con un mejor aprovechamiento de este sustrato de la síntesis hormonal. Sin embargo, resta

aún profundizar en los estudios sobre el mecanismo de tan diversas acciones de este halógeno, que por su diversidad y sensibilidad diferencial a la acción de inhibidores de la organificación parece responder a múltiples mecanismos, mas que a una única vía de acción generalizada.

1.2. El conjunto de resultados presentados indica la existencia de efectos noradrenérgicos sobre la respuesta a TSH, como resultado de una exposición persistente a la señal simpática. Bajo esta aproximación experimental, se han examinado tres etapas centrales en la síntesis de las hormonas tiroideas. En la primera serie de estudios, utilizando la línea celular FRTL-5, se ha caracterizado el efecto de la NE sobre la captación de yodo, como una señal que modula negativamente, de manera dosis-dependiente de NE y TSH, la respuesta a la señal hipofisaria. Este efecto, ejercido por la interacción con receptores adrenérgicos de tipo α_1 , es dependiente de la síntesis proteica y modula la respuesta a TSH de manera distal a la formación de AMPc. Por otro lado, en el mismo modelo experimental, se ha demostrado una acción noradrenérgica inhibitoria sobre el contenido de ARNm de Tg, aparentemente relacionada con una disminución en los niveles de síntesis de este mensajero, estimulada por TSH. Utilizando el modelo de desnervación unilateral crónica en ratas, se observó que la falta del estímulo simpático constituye una señal negativa en actividad de TPO asociada a la membrana celular, probablemente debida a una disminución en la cantidad de enzima activa. Este efecto, sin embargo, no parece tener mayores consecuencias en la eficiencia del proceso de organificación de yodo, ni sugiere cambios en la especificidad de sustrato. Por último, se ha observado que, en las células FRTL-5, la NE no altera el efecto proliferativo de la TSH.

La concentración utilizada de NE es comparable con la descrita en numerosos trabajos, asociada a efectos vinculados al aporte neural, mas que a la NE circulante. La falta de toxicidad de la catecolamina en las concentraciones utilizadas fue sugerida por la reversibilidad del efecto noradrenérgico en la captación de iodo (Figura 25, NE 24 h), y en la falta de efecto observado sobre otros transportadores (sistema de transporte de glucosa y de aminoácidos, AIB), además de no alterar la proliferación celular inducida por TSH.

Los tiempos de incubación utilizados han tenido por objeto evaluar el efecto de la actividad simpática persistente sobre la vía principal de "encendido" de la glándula: la TSH. Los cambios en la concentración sérica de TSH presentan, al igual que el ritmo de contenido de NE en la tiroides, un máximo y un mínimo, con valores constantes el resto del día (427). Sin embargo, cuando la NE alcanza un máximo, aproximadamente en la mitad del período de oscuridad (24 h), prácticamente coincide con un aumento agudo en la liberación de hormonas tiroideas, mientras que la TSH circulante se encuentra en concentraciones mínimas. Por el contrario, el máximo aumento de TSH circulante, correlaciona con un mínimo de actividad simpática tiroidea, que es rápidamente seguido de otro aumento en las hormonas tiroideas circulantes (427). Al respecto, se ha sugerido que el aumento nocturno de la liberación de hormonas tiroideas sería producto del efecto agudo del estímulo simpático, mientras que el aumento diurno de este parámetro sería la consecuencia del estímulo de la hormona hipofisaria sobre la tiroides, en condiciones de una mínima actividad simpática (395). Por lo tanto, parece probable la existencia de una interrelación entre la NE y la TSH, de cuyo balance dependen las respuestas agudas en la liberación de hormonas tiroideas. En este sentido, los resultados presentados avalan la hipótesis de la existencia de una acción

simpática condicionante de la respuesta tiroidea a la TSH circulante. Cabe mencionar que en la estimulación aguda de la liberación de iodo hacia el coloide, ambos moduladores ejercen su acción a través de la misma cascada de señales: inducen un aumento del "turnover" de los fosfoinosítidos, con un aumento del Ca^{++} citoplasmático. En contraposición con estos efectos agudos de la TSH y la NE, la mayor parte del ciclo de luz/oscuridad, las concentraciones de TSH séricas y el contenido de NE intratiroideo se mantienen en valores medios (395, 427), indicando una posible coexistencia de ambas señales. La acción crónica de la TSH sobre las células tiroideas induce un aumento en prácticamente todos los parámetros relacionados con la síntesis de hormonas tiroideas (90-95). En particular, aumenta la captación de iodo y la síntesis de Tg y de TPO, por distintos mecanismos que, sin embargo, son desencadenados por un estímulo del sistema adenilato ciclasa-AMPC (35, 93, 144). De acuerdo con los resultados presentados, la presencia de NE ejerce también una acción moduladora de tipo inhibitoria, en la respuesta a TSH de la captación de iodo y la síntesis de Tg. Si bien se ha sugerido que el sistema de señales asociado al AMPC regula negativamente la hidrólisis de los fosfoinosítidos y el aumento de Ca^{++} citoplasmático, las evidencias experimentales que indican que la TSH induce un aumento en la síntesis de receptores adrenérgicos α_1 que actúan a través de este último sistema de señales (405), sugieren una relación más compleja aún entre las respuestas desencadenadas por la TSH y la NE, dependiente de la cinética de cada una de ellas. Los resultados presentados indican que la activación adrenérgica, fundamentalmente de los receptores α_1 , modula a su vez distintas respuestas frente al aumento del AMPC. Por un lado, inhibe la captación de iodo y la síntesis de Tg, y por el otro, aparentemente es necesaria para mantener los niveles de síntesis de la TPO.

Por último, los resultados presentados en la sección 2. de *Resultados y Discusión* aportan evidencias para la evaluación de la utilidad potencial de distintos marcadores de diferenciación tiroidea en la caracterización de diversos crecimientos patológicos de este tejido. Contrariamente a lo sugerido por ciertos autores (470), nuestros resultados indican que el mensajero de TTF-1 no necesariamente correlaciona con la desaparición del fenotipo diferenciado tiroideo. Por el contrario, el contenido de los mensajeros de Tg y TPO muestra una gran variación que no parece asociable al grado de diferenciación tisular, en concordancia a lo señalado por distintos autores (451, 454). Finalmente, el nivel del ARNm de rTSH se encuentra ausente en la muestra correspondiente al CI, y en todos los casos en los que sus niveles se encontraron disminuídos, los demás parámetros de diferenciación resultaron relativamente bajos. Estos resultados no se contraponen con las evidencias de la literatura a partir de las cuales se ha señalado al ARNm de rTSH como uno de los mejores candidatos para ser utilizados en la prognosis o caracterización del crecimiento patológico tiroideo (454, 455).

ॐ ॐ ॐ

BIBLIOGRAFIA



- 1- Ganong WF. In: Fisiología Médica, WF Ganong (ed). El Manual Moderno SA de CV, México DF. XII Edición. 1990.
- 2- Capen CC. 1983. In: The Toxicology Forum. Proceedings of the 1983 Annual Winter Meeting, p 260. Arlington.
- 3- Gorbman A. In: The thyroid, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. IV Edición. 1978
- 4- Torand-Allerand D. In: The Thyroid. SH Ingbar. LE Braverman (eds). JB Lippincott Company. Philadelphia. V Edición. 1986.
- 5- Halmi NS. In: The thyroid, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). JB Lippincott Company. Philadelphia. V Edición. 1986
- 6- Dow CJ, Dumont JE, Ketrelbant P. 1986. C R Seans Soc Biol Fil. 180: 629.
- 7- Ericson LE, Engström G. 1978. Endocrinology. 103: 883.
- 8- Ericson LE, Ring KM, Ofverholm T. 1983. Endocrinology 113: 1746.
- 9- DeGroot LJ. 1989. Endocrinology, Grune & Stratton. Orlando 10 Werner SC, Ingbar S (1991) In The Thyroid: A fundamental and Clinical Text (Braverman LE, Utiger RD, eds) pp1, JB Lippincott, Philadelphia.
- 10- Werner SC, Ingbar S (1991) In The Thyroid: A fundamental and Clinical Text (Braverman LE, Utiger RD, eds) pp1, JB Lippincott, Philadelphia
- 11- Melander A, Sundler F, Westgren U. 1973. Endocrinology 93: 193.
- 12- Melander A, Sundler F, Westgren U. 1975. Endocrinology 96: 102.
- 13- Cardinali D, Romeo HE. 1990. NIPS 5: 100.
- 14- Nonidez JF. 1931. Am J Anat 48: 299.
- 15- Rhinehart DA. 1912. Am J Anat 13: 91.
- 16- Melander A, Sundler F. 1979. Endocrinology 105: 7.
- 17- Van Sande J, Dumont JE, Melander A, Sundler F. 1980. J Clin Endocrinol Metab. 51: 500.

- 18- Ahrén B, Alumets J, Ericsson M, Fahrenkrug J, Fahrenkrug L, Hakanson R, Hedner P, Lorén I, Melander A, Rerup C, Sundler F. 1980. *Nature* 287: 343.
- 19- Hedge GA, Huffman LJ, Grunditz T, Sundler F. 1984 *Endocrinology* 115: 2071.
- 20- Ahrén B, Grunditz T, Ekman R, Hakanson R, Sundler F, Uddman R 1983. *Endocrinology* 113: 379.
- 21- Grunditz T, Hakanson R, Rerup C, Sundler F, Uddman R. 1984. *Endocrinology* 115: 1537.
- 22- Stubbe P, Schulte FJ, Heidemann P. 1986 *Bibl Nutr Dieta*. 38: 206.
- 23- Halmi NS. 1961. *Vitam Horm*. 19: 133
- 24- Wolff J. 1964. *Physiol Rev*. 44: 45.
- 25- Bastomsky CH. 1974. In *Handbook of Physiology* (Geiger, SR, ed)), Vol 3, American Physiological Society, Washington.
- 26- Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. 1984. *Endocrinology*. 114: 1108.
- 27- Carrasco N. 1993. *Biochim Biophys Acta*. 1154: 65
- 28- Woodbury DM, Woodbury JW. 1963. *J. Physiol. (London)* 169: 553.
- 29- Takasu N, Handa Y, Shimizu Y, Yamada T. 1981. *Endocrinology*. 101: 189.
- 30- Williams JA. 1969. *Am J Physiol*. 217: 1094.
- 31- Nilsson M, Björkman U, Ekholm R, Ericson LE. 1990. *Eur J Cell Biol* 52: 270
- 32- Van Herle JA, Vassart G, Dumont JE, 1979. *N Eng J Med* 301: 239.
- 33- Di Lauro R, Metafora S, Consiglio E, Gentile G, Varrone S. 1975. *J Biol Chem*. 250: 3267.
- 34- Christophe D, Vassart G. 1990. *TEM Sept/Oct*: 351.
- 35- Van Heuverswyn B, Streydio C, Brocas H, Refetoff S, Dumont JE, Vassart G. 1984. *Proc Natl Acad Med USA*. 81: 5941.
- 36- Ericsson L. 1981. *Moll. Cell Endocrinol*. 22: 1.
- 37- Medeiros Neto G, Targovnik H, Knobel M, Propato F, Varela V, Alkmin M, Barbosa S, Wajchenberg B. 1989. *J Endocrinol Invest*. 12: 805.

-
- 38- Cabrera B, Brocas H, Perez Castillo A, Pohl V, Navas J, Targovnik H, Centenera J, Vassart G. *J Clin Endocrinol Metab.* 63: 931.
- 39- Targovnik H, Cochaux P, Corach D, Vassart G. 1992. *Mol Cell Endocrinol.* 84, R23
- 40- Schumacher M., Camps (ui!) S, Maulet Y, Newton M, Mac Phee-Quigley K, Taylor S, Friedman T, Taylor P. 1986. *Nature:* 319, 407
- 41- Nozomu Mori, Itoh N, Salvaterra PA. 1987. *Proc Natl Acad USA.* 84, 2813.
- 42- Marcheggiano A, Iannoni A, Davoli C. 1985. *Cell Tissue Res* 241: 429.
- 43- Swillens S, Ludgate M, Merken L, Dumont JE, Vassart G. 1986. *Biochem Biophys Res Commun* 137: 142.
- 44- Taurog A. 1986. in Werner's *The Thyroid* (Ingbar SH, and Braverman, LE, eds). JB Lippincott, Philadelphia, P A.
- 45- Wollman SH, Ekholm R. 1981. *Endocrinology* 108: 2082.
- 46- Björkman U, Ekholm R. 1984. *Endocrinology* 115: 392.
- 47- Libert F, Ruel J, Ludgate M, Swillena S, Alexander N, Vassart G, Dinsart C: 1987. *Nucleic Acids Res.* 15: 6735.
- 48- Ronald P, Magnuson RP, Chazenbalk G, Gestautas J, Seto P, Filletti S, DeGroot L, Rapaport B. 1987. *Mol Endocrinol.* 1: 856.
- 49- Zanelli E, Henry M, Charvet B, Malthiery Y. 1990. *Biochem Biophys Res Commun.* 170: 735.
- 50- Czarnocka B, Ruf J, Ferrand M, Lissitziky S. 1985. *FEBS Lett.* 190: 147.
- 51- Portmann L, Fitch FW, Habram W, Hamada N, Franklin WA, DeGroot LJ. 1988. *J Clin Invest.* 81: 1217
- 52- Yokoyama N, Taurog A, Klee GG. 1989. *J Clin Endocrinol. Metab.* 68: 766.
- 53- Torresani J, Roques M, Peyrot A, Lissitsky S. 1968. *Acta Edocrinol.* 57: 153.
- 54- De Vijlder JJM, Van Voorthuizen WF, Van Dijk JE, Rijenberk A, Tegalaers WWH. 1978. *Endocrinology.* 102: 19
- 55- Taurog A. 1970. *Arch. Biochem. Biophys.* 139: 212.

-
- 56- Ait Hammou N, Virion A, Deme D, Pommier J. 1987. *Horm Metabol. Res.* 19: 606.
- 57- DeGroot LJ, Niepomniszcze N. 1977. *Metabolism* 26: 665.
- 58- Leer LM, Ossendorp FA, Stert A, Bruning PF, de Vijder JJM. 1989. in: Ambesi-Impimbato FS, Perrild H (eds). *FRTL-5 Today*. Amsterdam: Elsevier: 167.
- 59- Marriq C, Rolland M, Lissitzky S. 1982. *EMBO J.* 1: 397.
- 60- Malthiery Y, Lissitzky S. 1987. *Eur J Biochem.* 165: 491.
- 61- Marriq C, Lejeune PJ, Venot N, Vinet L. 1989. *FEBS Lett.* 242: 414.
- 62- Rawitch A, Pollock G, Taurog A. 1991. *Proceedings of the 10th International Thyroid Conference, The Hague, Abstr.* 365: 220
- 63- Iino S, Yamada T, Greer M. 1961. *Endocrinology* 68: 582
- 64- Engler H, Taurog A, Dorris M. 1982. *Endocrinology.* 110: 190.
- 65- Mariotti S, Anelli S, Ruf J, Bechi R, Czarnocka B, Lombardi A, Carayon P, Pinchera A. 1987. *J Clin Endocrinol Metab.* 65: 987.
- 66- Selmi S, Rousset B. 1988. *Biochem J* 253: 523.
- 67- Meanhaut C, Lefort A, Libert F, Parmentier M, Raspe E, Roger P, Corvilain B, L Laurent E, Reuse S, Mockel J, Lamy F, Van Sande J, Dumont JE. 1990. *Horm Metab Res(Suppl)* 23:52.
- 68- Dumont JE, Meanhaut C, Pirson I, Baptist M, Roger PP. 1991. *Bailliere's Clin Endocrinol Metab* 5: 727.
- 69- Dumont JE, Vassart G, Refetoff S. 1989. in *The Metabolic Basis of Inherited Diseases*, ed 6. McGraw-Hill Inc, New York, vol:2: 1843
- 70- Larsen PR. 1982. *N Engl J Med* 306: 23.
- 71- Morley J. 1981. *Endocrine Reviews.* 2: 396.
- 72- Spira O, Birkenfeld A, Avni A, Gross J, Gordon A. 1979. *Acta Endocrinol (Kbh).* 92: 502.
- 73- Vale W, Burgus R, Guillemin R. 1968. *Neuroendocrinol.* 3: 34.
- 74- Perrone M, Hinkle P. 1978. *J Biol Chem.* 253: 5168.

-
- 75- De Lean A, Ferland L, Drovin J, Kelly P, Labrie F. 1977. *Endocrinology* 100: 1496.
- 76- Taylor T. *Neuroendocrinol.* 262: 5213.
- 77- Amir S, Carraway T, Kohn L. 1973. *J Biol Chem.* 248: 4092
- 78- Parmentier M, Libert F, Meanhaut C, Lefort A, Gerard C, Perret J, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. 1989. *Science* 246:1620.
- 79- Yamashita K, Field JB. 1970. *Biochem Biophys Res Commun* 40: 171.
- 80- Wolff J, Jones AB. 1971. *J Biol Chem* 246: 3939.
- 81- Dumont JE, Roger PP, van Heuverswyn B, Emeux C, Vassart G. 1981. *Adv Cyclic Nucl Res* 14: 479.
- 82- Lamy F, Roger P, Contor L, Reuse L, Raspe E, van Sande J, Dumont JE. 1987. *Horm Cell Regul* 153: 169
- 83- Mockel J, Laurent E, Lejeune C, Dumont JE. 1991. *Mol Cell Endocrinol* 82: 221.
- 84- Corda D, Marcocci C, Kohn LD, Axelrod J, Luini A. 1985. *J Biol Chem.* 5: 9230
- 85- Van Herle JA, Vassart G, Dumont JE. 1979. *N Eng J Med* 301: 239.
- 86- Igarashi Y, Kondo Y. 1980. *Biochem Biophys Res Commun.* 97: 759.
- 87- Black EG, Sheppard MC, Hoffenberg R. 1984. *J Endocrinol* 101: 107.
- 88- Field JB, Ealey PA, Marshall N, Cockcroft S. 1987. *Biochem J* 247: 519
- 89- Ginsberg J, Murray PG. 1988. *FEBS Lett* 226: 223
- 90- Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. 1984 *Endocrinology* 114:1099
- 91- Williams J, Maloyan, S. 1975. *Endocrinology* 97: 162
- 92- Tong W. 1965. *Endocrinology* 76: 163.
- 93- Davies E, Dumont JE, Vassart G. 1978. *Biochem J.* 172: 227
- 94- Fourchier F, Mego J, Dang J, Simon C. 1983. *Endocrinology* 103: 62.
- 95- Lamy FM, Rodesch FR, Dumont JE. 1967. 46: 518
- 96- Dumont JE, Vassart G. 1980. *Endocrinology* 1: 311.

-
- 97- Levine MA, Ahn TG, Klupt SF, Kaufman KD, Smallwood PM, Bourne HR, Sullivan KA, VanDop C. 1988. *Proc Natl Acad USA*. 85: 617.
- 98- Weinstein LS, Shenker A, German PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. 1991 *N Engl J Med*. 325: 1688
- 99- Furmaniak J, Rees Smith B. 1990. *Autoimmunity*. 7: 63.
- 100- Rees Smith B, Mc Lachlan SM, Furmaniak J. 1988. *Endocrin Rev*. 9: 106
- 101- Vassart G, Dumont JE. 1992. *Endocrine Rev*. 13: 596.
- 102- Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, Dumont JE, Vassart G. 1989. *Biochem Biophys Res Commun*. 165: 1250.
- 103- Nagayama Y, Kaufman KD, Seto P, Rapaport B. 1989. *Biochem Biophys Res Commun*. 165: 1184
- 104- Gross B, Misrahi M, Sar S, Milgrom E. 1991. *Biochem Biophys Res Commun* 177: 679.
- 105- Libert F, Passage E, Lefort A, Vassart G, Mattei MG. 1990 *Cytogenet Cell Genet* 54: 82.
- 106- Rosseau-Merck MF, Misrahi M, Loosfelt H, Atger M, Milgrom E, Berger R. 1990. *Genomics* 8: 233.
- 107- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. 1989. *Biochim Biophys Acta* 1031: 163.
- 108- O'Dowd BF, Lefkowitz R, Caron M. 1989 *Annu Rev Neurosci*. 12: 67
- 109- Collins S, Lohse MJ, O'Dowd B, Caron M, Lefkowitz R. 1991. *Vitam Horm* 46: 1.
- 110- Delbeke D, Van Sande J, Swillens S, Erneux C, Dumont JE. 1981. *Metabolism*. 31: 797.
- 111- Field JB, Bloom G, Cheng-Ying C. 1977 *J Clin Invest*. 59: 659.
- 112- Meanhaut C, Brabant G, Vassart G, Dumont JE. 1992. 267: 3000
- 113- Chazenbalk G, Nagayama Y, Kaufman K, Rapaport B. 1990. *Endocrinology* 127: 1240.
- 114- Mauchamp J, Charrier B, Takasu N, Margotat A, Chambard M, Dumas D. 1979. *Horm Cell Regul* 3: 51
- 115- Roger PP, Dumont JE. 1984. *Mol Cell Endocrinol* 36: 79.
- 116- Halmi NS, Granner DK, Doughman DJ, Peters BH, Muller D. 1960. *Endocrinology* 67: 70.

-
- 117- Golstein P, Abramov M, Dumont JE, Beauwens R. 1992. *Am J Physiol.* 263: C590.
- 118- Knopp J, Stolc V, Tong W. 1979. *J Biol Chem.* 245: 4403.
- 119- Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. 1984 *Endocrinology.* 114: 1090.
- 120- Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato ES, Grollman EF. 1983. *Endocrinology* 114: 1099
- 121- Lecocq RF, Dumont JE. 1972. *Biochim Biophys Acta.* 281: 434.
- 122- Sherwing JR, Tong W. 1976. *Biochim Biophys Acta* 425: 502.
- 123- Avvedimento VE, Tramontano D, Ursini MV, Monticelli A, Di Lauro R. 1984. *Biochem Biophys Res Commun.* 122: 472.
- 124- Roger PP, Van Heuverswyn B, Lambert C, Reuse S, Vassart G, Dumont JE. 1985. *Eur J Biochem* 152: 239
- 125- Christophe D, Gerard C, Juvenal G, Bacolla A, Teugels E, Ledent C, Christophe Hobertus C, Dumont JE. 1989. *Mol Cell Endocrinol* 64: 5.
- 126- Lee N, Nayfeh SN, Chae C. 1991. *Biochem J* 278: 609.
- 127- Gonzalez GA, Montminy MR. 1989. *Cell* 59: 675.
- 128- Woloshim PI, Walton KM, Reh fuss RP, Goodman RH, Cone RD. 1992. *Mol Endocrinol.* 6: 1725.
- 129- Gerard C, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE. Vassart G. 1989. *Mol Endocrinol* 3: 2110
- 130- Hansen C, Javaux F, Juvenal G, Vassart G, Chistophe D. 1989. *Biochem Biophys Res Commun* 160: 722.
- 131- Musti AM, Ursini VM, Avvedimento E, Zimarino V, Di Lauro R. 1987. *Nucl Acids Res* 15: 8149.
- 132- Sinclair AJ, Lonigro R, Civitareale D, Ghibelli L, Di Lauro R. 1990. *Eur J Biochem* 193: 311.
- 133- Skinner CA, Kelly D, Kao LR, Nayfeh SN, Popko B, Chae CB. 1992. *Mol Cell Endocrinol.* 90: 33.
- 134- Civitareale D, Lonigro R, Sinclair AJ, Di Lauro R. 1989. *EMBO J* 8: 2537

-
- 135- Santiesteban P, Acebron A, Polycarpou- Schwartz M, Di Lauro R. 1992. *Mol Endocrinol* 5: 1310.
- 136- Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R. 1992. *Mol Cell Biol* 12: 4230.
- 137- Plachov D, Chowdhury K, Walther C, Simon D, Guenet JL, Gruss O. 1990. *Development* 110: 643.
- 138- Donda A, Javaux F, Van Renterghem P, Gervy-Decoster C, Vassart G, Christophe D. 1993. *Mol Cell Endocrinol* 90: R23.
- 139- Chazenbalk G, Magnusson RP, Rapaport B. 1987. *Mol Endocrinol* 1: 913.
- 140- Damante G, Chazenbalk G, Russo D, Rapaport B, Foti D, Filetti S. 1989. *Endocrinology* 124: 2889.
- 141- Foti D, Gestautas J, Rapaport B. 1990. *Biochem Biophys Res Commun* 168: 281.
- 142- Ossendorp FA, Leer LM, Bruning PF, van den Brink JA, Sterk A, De Vijlder JJM. 1989. *Mol and Cellular Endocrinol* 66: 199.
- 143- Ossendorp FA, van der Brink JAM, de Vijlder JJM, Bruning PF. 1989. in: Ambesi-Impiombato FS, Perrild H (eds). *FRTL-5 Today*. Amsterdam: Elsevier: 167.
- 144- Gerard CM, Lefort A, Libert F, Christophe D, Dumont JE, Vassart G. 1988. *Mol Cell Endocrinol* 60: 239.
- 145- Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. 1988. *J Biol Chem*. 263: 9063.
- 146- Damante G, DiLauro R. 1994. *Biochi Biophys Acta* 1218: 255.
- 147- Francis-Lang H, Price M, Polycarpou-Schwartz M, Di Lauro R. 1992. *Mol Cell Biol*. 12: 576.
- 148- Parvin JD, Timmers M, Sharp PA. 1992. *Cell* 68: 1135.
- 149- Dumont JE, Janaiux JC, Roger PP. 1989. *Trends Biochem Sci* 14: 67.
- 150- Dumont JE. 1971. *Vitam Horm* 29: 287.
- 151- Wynford-Thomas D, Stringer J, Williams ED. 1982. *J Endocrinol* 94 :131.
- 152- Wynford-Thomas D, Stringer J, Williams ED. 1982. *Acta Endocrinol* 100: 46.
- 153- Peter MJ, Gerber M, Studer H, Smeds S. 1985. *J Clin Invest* 76: 1992

-
- 154- Isler M. 1974. Anat Rec. 180: 369.
- 155- Williams DW, Wynford-Thomas D, Williams ED. 1987. Mol Cell Endocrinol 51: 33
- 156- Van Sande J, Lefort A, Beebe S, Roger P, Perret J, Corbin J, Dumont JE. 1989. Eur J Biochem 183: 699.
- 157- Jolin T, Tarin M, Garcia MD. 1974. Acta Endocrinol 75: 734.
- 158- Roger P, Servais P, Dumont JE. 1983. FEBS Lett 157: 323.
- 159- Roger P, Taton M, Van Sande J, Dumont JE. 1988, J Clin Endocrinol Metab 66: 1158.
- 160- Smith PD, Wynford-Thomas D, Stringer MJ, Williams ED. 1986. Endocrinology 119: 1439.
- 161- Tramontano D, Chin WW, Moses AC, Ingbar SH. 1986 J Biol Chem 261: 3919.
- 162- Chapman A. 1941 Endocrinology 29: 680.
- 163- Halmi NS, Stuelke R. 1956. Metabolism 5: 646.
- 164- Ingbar SH. 1972. Mayo Clin Proc 47: 814
- 165- Nagataki S. 1974. In: Green MA, Solomon DH (eds). Thyroid, Handbook of Physiology, section 7, Endocrinology.
- 166- Pisarev MA. 1985. J Endocrinol Invest 8: 475.
- 167- Halmi NS, Spiros B. 1955. Endocrinology 56: 157.
- 168- Wollman SH, Reed F. 1958. Am J Physiol 194: 28.
- 169- Sherwin JR, Tong W. 1974. Endocrinology 72: 100.
- 170- Berkowitz M, Daughttridge D, Sherwin RS. 1981. Am J Physiol. 240: E37.
- 171- Galton VA, Pitt-Rivers RV. 1959. Endocrinology 64: 835.
- 172- Socolow E, Dunlap D, Sobel R, Ingbar SH. 1968. Endocrinology 83: 737.
- 173- Morton M, Chaikoff IL, Rosenfeld S. 1944. J Biol Chem 154: 381.
- 174- Wolff J, Chaikoff IL. 1948. J Biol Chem 174: 555.
- 175- Pisarev MA, DeGroot LJ, Hati R. 1971. Endocrinology 88: 1217
- 176- Ochi Y, DeGroot LJ. 1969. Endocrinology 84: 1305
- 177- Yamada T, Lewis A. 1968. Endocrinology. 82: 54

-
- 178- Onaya T, Halmi NS. 1967. *Endocrinology* 81: 643
- 179- Onaya T, Tomizawa T, Yamada T, Schichijo K. 1966. *Endocrinology* 79: 138
- 180- Vegenakis A, Dows F, Braverman L, Ingbar SH. 1973. *J Clin Invest.* 52: 528.
- 181- Green W, Ingbar SH. 1962. *J Clin Invest* 41: 173.
- 182- Shishiba T, Takaishi M, Miyachi Y, Ozawa Y. 1975. *Endocrinol Jpn* 22: 367.
- 183- Shimizu T, Shishiba Y. 1975. *Endocrinol Jpn* 22:55
- 184- Lamas L, Couvreur M, Obregon M, Hove-Vandenbroucke M. 1982. *Endocrinology* 110: 804.
- 185- DeRobertis E, Nowinski W. 1946. *Science* 103: 421.
- 186- Takeuchi K, Suzuki H, Sawada M, Horiuchi Y. 1970. *Endocrinology.* 86: 1239.
- 187- Pisarev MA, Altschuler N. 1973. *Acta Endocrinol (Kph)* 74: 703
- 188- Pochet R, Van Sande J, Erneux C, Dumont JE. 1977. *Febs Lett* 83: 33.
- 189- Filetti S, Rapaport B. 1983. *Endocrinology* 113: 1608
- 190- Uchimura H, Cheng Chiu S, Kuzaya N, Ikeda H, Ilo K, Nagataki S. 1980. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 1066.
- 191- Burke G. 1968. *Endocrinology* 82: 1170.
- 192- Galli Mainini C. 1941. *Endocrinology* 29: 674
- 193- Uchimura H, Amir S, Ingbar SH. 1979. *Endocrinology* 104: 1207.
- 194- Jarret R, Field JB. 1964. *Endocrinology* 75: 711.
- 195- Green WL. 1966. *Endocrinology* 79: 1966.
- 196- Burke G. 1968. *Endocrinology.* 83: 495.
- 197- Katakai S, Yamada T, Schichijo K. 1966. *Metabolism* 15: 271.
- 198- Pisarev MA, Itoiz ME. 1972. *Endocrinology* 90: 1409.
- 199- Saddok C, Gafni M, Gross. 1978. *Acta Endocrinol (Kbh)* 88: 517
- 200- Rapaport B, West M, Ingbar SH. 1976. *Endocrinology* 99: 11.
- 201- Hashimune K, Akasu F, Takazawa K, Endo W, Onaya T. 1976. *Endocrinology* 99: 1463.

- 202- Bray G. 1968. *J Clin Invest* 47: 1640.
- 203- Naeije R, Vanhaelst L, Golstein J. 1978. *Horm Metab Res* 10: 521.
- 204- Matsuzaki S, Kakegawa T, Suzuki M, Hamana K. 1978. *Endocrinol Jpn* 25: 129.
- 205- Astwood EB, Bissel A. 1944. *Endocrinology* 34: 282.
- 206- Halmi NS. 1954. *Endocrinology* 54: 216.
- 207- Sherwin JR, Tong W. 1974. *Endocrinology* 94: 1465.
- 208- Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tomaccini D, Santiesteban P. 1986. *Endocrinology* 118: 2477.
- 209- Serif G, Kirkwood S. 1956. *Endocrinology* 58: 23.
- 210- Fawcett D. 1968. *Can J Biochem* 46: 1433.
- 211- Nunez J, Pommier J. 1982. *Vitam Horm.* 39: 175.
- 212- Ingbar SH. in: Werner Sc Ingbar SH (eds) *The Thyroid*. Harper & Row. NY. 1978.
- 213- Wolff J, Chaikoff IL. 1948. *Endocrinology* 42: 648.
- 214- Braverman L, Ingbar SH. 1963. *J Clin Invest* 42: 648.
- 215- Nagataki S, Shimune K, Nakao K. 1966. *Endocrinology* 79: 667.
- 216- Nagataki S, Ingbar SH. 1964. *Endocrinology* 74: 731.
- 217- Benua R, Lippset MB. 1959. *J Clin Endocrinol Metab* 19: 19.
- 218- Goldsmith R, Herbert C, Lutsch G. 1958. *J Endocrinol Metabolism* 18: 367.
- 219- Wartotsky L, Ransil B, Ingbar SH. 1970. *J Clin Invest.* 49: 78
- 220- Yamada T, Lino S, Schichijo K. 1966. *Endocrinology* 79: 138.
- 221- Ohtake M, Sato A, Onaya T, Tamada T. 1973. *Endocrinology.* 93: 343.
- 222- Rapaport BM, West N, Ingbar SH. 1975. *J Clin Invest.* 56: 516
- 223- Sherwin JR, Tong W. 1975. *Biochem Biophys Acta.* 404: 30.
- 224- Van Sande J, Dumont JE. 1973. *Biochem Biophys Acta.* 313: 320.
- 225- Van Sande J, Erneux C, Dumont JE. 1977. *J Cyclic Nucleotide Res.* 3: 335.
- 226- Laurent E, Mockel J, Takazawa K, Erneux C, Dumont JE. 1989. *Biochem J.* 263: 795.

- 227- Anderson EM, Evans HM. 1937. Am J Physiol. 120: 597.
- 228- Vanderlaan W, Vanderlaan N, Logan M. 1941. Endocrinology. 29: 93.
- 229- Jonckheer MH, Michotte Y, Van Steirteghem AC, Deconinck. 1983. J Endocrinol Invest. 6: 267.
- 230- Ahren B. 1986. Endocr Rev. 7: 149.
- 231- Cardinali DP, Romeo H. 1991. Frontiers in Neuroendocrinology. 12: 278
- 232- Cunliffe WJ. 1961. Acta. Anat. (Basel). 46:135.
- 233- Melander A. 1977. Acta Med Scand 201: 257.
- 234- Harrison TS. 1964. Physiol Rev. 44: 161.
- 235- Hausmann W. 1972. Hormones. 3: 313.
- 236- Turner P. 1974. Drugs. 7: 48.
- 237- Waldstein SS. 1966. Ann Rev Med. 17: 123.
- 238- Cardinali DP, Romeo HE, Vacas MI. 1987. Adv Pineal Res. 2: 35.
- 239- Ahren B. 1985. Acta Endocrinol (Copenh). 108: 184.
- 240- Melander A. 1970. Acta Endocrinol (Copenh). 65:371
- 241- Melander A, Sundler F. 1972. Endocrinology. 90: 188
- 242- Melander A, Ericson LE, Sundler F. 1974. Life Sci. 14: 237
- 243- Cardinali D, Pisarev MA, Barontini M, Juvenal GJ, Boado RJ, Vacas MI. 1982. Neuroendocrinology. 35: 248.
- 244- Boado RJ, Hedner P. 1989. Neuroendocrinology 49: 471.
- 245- Yamashita K, Yamashita S, Ogata E. 1977. Life Sci. 21: 607.
- 246- Toccafondi RS, Brandi ML, Rotella CM, Zonefrati R. 1983. Acta Endocrinol (Copenh) 102: 62.
- 247- Brandi ML, Rotella CM, Tanini A, Toccafondi RS. 1983. Acta Endocrinol (Copenh.). 104: 64.
- 248- Aiyoshi Y, Yamashita K, Yamashita S, Ogata E. 1978. Endocrinology. 102: 1527.
- 249- Erneux C, Van Sande J, Dumont JE, Boeynaems JV. 1977. Eur J Biochem. 72: 137.

- 250- Mills I, Sherwin JR. 1985. *Endocrinology*. 116: 1310.
- 251- Yamashita K, Yamashita S, Aiyoshi Y. 1980. *Live Sci*. 27: 1127.
- 252- Muraki T, Uzumaki H, Nakadate T, Kato R. 1982. *Endocrinology*. 110: 51.
- 253- Ahren B, Hedner P. 1989. 49 : 478.
- 254- Melander A, Ranklev E, Sundler F, Westegren U. 1975. *Endocrinology*. 97: 332.
- 255- Ahren B, Rerup C. 1983. *Eur J Pharmacol*. 88: 383.
- 256- Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Boado RJ, Barontini M, Vacas MI. 1983. *Acta Physiol Latinoam*. 33: 165.
- 257- Boado RJ, Romeo HE, Cardinali DP, Zaninovich A. 1989. *Annu Meet Endocr Soc 71st*, Seattle, WA, p 481.
- 258- Franzer J, Beaston-Wimmer P, Smolen AJ. 1986. *Society for Neuroscience Abstracts*, 12: 1522
- 259- Friedgood HB, Cannon WB. 1940. *Endocrinology* 26:142
- 260- Decoster C, Van Sande J, Dumont JE. 1976. *FEBS Lett*. 66:191.
- 261- Romeo HE, Diaz MC, Ceppi J, Zaninovich AA, Cardinali DP. 1988. *Endocrinology* 122: 2527
- 262- Söderberg U. 1958. *Acta Physiol Scan* 42: (Suppl. 147): 1.
- 263- Toccafondi RS, Brandi ML, Melander A. 1984. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 157.
- 264- Molinero P, Calvo JR, Gobema R, Guerrero JM. 1985. *Biochem Biophys Res Commun*. 128: 1336.
- 265- Ahren B, Häkanson R, Rerup C. 1982. *Acta Physiol Scand* 114: 471
- 266- Ahren B. 1984. *Peptides*. 5: 305.
- 267- Sisson JC, Beierwalters WR, Patton G. 1964. *Endocrinology*. 74: 925.
- 268- De Groot LJ, Nakai A, Sakurai A, Macchia E. 1989. *J Endocrinol Invest*. 12: 843.
- 269- Geelhoed- Duijvestijn PH, Bussemaker JK, Roelfsema F. 1989. *Acta Endocrinol* 121: 207
- 270- Lamberg BA, Pelkonen R, Aro A, Grahne B. 1976. *Acta Endocrinol* 82: 254.

- 271- Miyakawa MM, Saji M, Tsushima T, Wakai K, Shizume K. 1988. J Clin Endocrinol Metab. 67: 973.
- 272- Wüster C, Steger G, Schmelzle A, Gottwintwr J, Minne HW, Ziegler R. 1991. Horm Metab Res. 23: 131.
- 273- Yoshimura M, Nishikawa M, Horimoto M, Yoshikawa N, Sawaragi S, Horikoshi Y, Kinada M. 1990. Acta Endocrinol 123: 277
- 274- Yoshimura M, Nishikawa M, Horimoto M, Yoshikawa N, Sawaragi S, Horikoshi Y, Kinada M. 1990. Acta Endocrinol 124: 178
- 275- Pekonen F, Alfthan H, Stenman UH, Ylikorkala O. 1988. J Clin Endocrinol Metab 66: 853.
- 276- Emoto N, Isozaki O, Arai M, Murakami H, Shizume K, Baird A, Tsushima T, Demura H. 1991. Endocrinology 128: 58
- 277- Errick JE, Ing KWA, Eggo MC, Burrow GN. 1986. In Vitro 22: 28
- 278- Fayet G, Hovsépian S. 1985. In: Thyroglobulin, the prothyroid hormone. Eggo MC and Burrow Eg (eds). New York: Raven
- 279- Gerard CM, Roger PP, Dumont JE. 1989. Mol Cell Endocrinol. 61: 23.
- 280- Kasai K, Hiraiwa EM, Suzuki Y, Emoto T, Banda M, Nakamura T, Shimoda SI> 1987. Acta Endocrinol 114: 398
- 281- Maciel RMB, Mores AC, Villone G, Tramontano D, Ingbar SH. 1988. J Clin Invest 82: 1546.
- 282- Ollis CA, Davies R, Munro DS, Tomlinson S. 1986. J Endocrinol 108: 393.
- 283- Roger PP, Dumont JE. 1982. FEBS Lett. 144: 209.
- 284- Tramontano D, Rotella CM, Toccafondi R, Ambessi-Impimbato SE. 1986. Endocrinology 118: 862.
- 285- Williams DW, Williams ED, Winford-Thomas D. 1988. Br J Cancer 57: 535
- 286- Grubeck-Loebenstien B, Bujan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, Valthouse W, Feldman M. 1989. J Clin Invest 83: 764.

- 287- Tsushima T, Arai M, Saji M, Ohba Y, Murakami H, Ohmura E, Sato K, Shizume K. 1988. *Endocrinology*. 123: 1187.
- 288- Wyllie FS, Dawson T, Bond JA, Goretzki P, Game S, Prime S, Winford- Thomas D. 1991. *Mol Cell Endocrinol*. 76: 13.
- 289- Ingbar SH. In: *The thyroid*, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. V Edición.1986
- 290- Graves R.G. 1835. *Lond Med & Surgical J*. 7: 516.
- 291- Basedow KA von. 1840. *Wschr ges Heilk*. 14: 197
- 292- Huber GK, Safirstein R, Neufeld D, Davies TF. 1991. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 1142.
- 293- Van Sande J, Lamy F, Lecocq R, Mirkine N, Rocmans P, Cochaux P, Mockel J, Dumont JE. 1988. *J Clin Endocrinol Metab*. 66: 570.
- 294- Rojeski MT, Gharib H. 1985. *N Engl J Med* 131: 428.
- 295- Hoffenberg R. In: *The thyroid*, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. V Edición.1986
- 296- Pinchera A, Martino E, Faglia G. In: *The thyroid*, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. V Edición.1986
- 297- Stanbury JB, Hetzel BS. In: *Endemic Goiter and Endemic cretinism*. Stanbury & Hetzel (eds).New York, John Wiley & Sons.1980
- 298- Studer H, Gebel F. In: *The thyroid*, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. V Edición.1986
- 299- Matovinovich J. In: *The thyroid*, S.C. Werner y S H Ingbar (eds). Harper & Row, New York. V Edición.1986
- 300- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cochaux CG, Mockel J, Dumont JE, Vassart G. 1993. *Nature*. 365: 649.
- 301- Hellstern P, Keller HE, Weinheimer B, Wesch H. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 9: 351.
- 302- Jin S, Homicek FJ, Neylan D, Zakarija M, McKenzie M. 1986. *Endocrinology*. 119: 802.

- 303- Wynne Williams D, Dillwyn Williams E, Wynford-Thomas D. *Mol Cel Endocrinol* 61: 139.
- 304- Landis CA, Masters SB, Spada A, Pace AM, Bourne HR, Vallar L. 1989. *Nature Lond.* 340: 692.
- 305- Parma J, Duprez L, Van Sande J, Cocheaux P, Gervy C, Mockel J, Dumont JE, Vassart G. 1993. *Nature* 365: 649.
- 306- Wolff J. 1983. *Endocrine Rew.* 4: 240
- 307- Nagatki S, Uchimura H, Masuyama Y, Nakao K, Ito K. 1972. *J Endocrinol Metab.* 5: 18.
- 308- Lever E, Medeiros Neto G, De Groot L. 1983. *Endocrine Rew.* 4: 213
- 309- Abs R, Verhelst J, Schoofs E, De Sommer E. 1991. *Cancer* 67: 2191.
- 310- Medeiros Neto G, Nakashima T, Taurog A, Knobel M, Simonetti J, Mattar E. 1979. *Clin Endocrinol.* 11:123.
- 311- Targovnik H, Cochaux P, Corach D, Vassart G. 1992. *Molec & Cell Endocrinol.* 84: R23.
- 312- Lever E, Medeiros Neto G, De Groot L. 1983. *Endocrine Rew.* 4: 213.
- 313- Kusakabe T, 1975. *Metabolism.* 24: 1103.
- 314- Niepomiszcz H., Rosembloom A, De Groot L, Shimaoka K, Refetoff S, Yamamoto K. 1973. *Metabolism.* 24: 57.
- 315- Medeiros Neto G, Targovnik H, Vassart G. 1993. *Endocrine Rew.* 14: 165.
- 316- Ieri T Cochaux P, Targovnik H, Suzuki M, Shimoda S, Perret J, Vassart G. 1991. *J Clin Invest* 88: 1901
- 317- Targovnik H, Varela V, Juvenal G, Propato F, Chester H, Krawiec L, Frechtel G, Moran D, Perinetti H, Pisarev M, 1990. *J Clin Endocrinol Invest.* 13: 797.
- 318- Targovnik H, Propato F, Varela V, Wajchenberg B, Knobel M, Dabronzo H, Medeiros Neto G. 1989. *J Clin Endocrinol Metab.* 69: 1137. M, 1990. *J Clin Endocrinol Invest* 13: 797.
- 319- Hashimoto H. 1912. *Langenbecks Arch Chir* 9: 219
- 320- Berthier C. 1978. *Acta Lemarchand Beraud. Acta Endo* 89:567
- 321- Otha K, Endo T, Onaya T. 1991. *Biochem Biophys Res Commun.* 174: 1148

- 322- Brabant G, Meanhaut C, Köhle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE. 1991. *Mol Cell Endocrinol* 82: R7.
- 323- Dunn J, Ray S. 1973. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 36: 1088
- 324- Berge-Lefranc JL, Cartouzou G, De Micco C, Fragu F, Lissitzky S. 1985. *Cancer* 56: 345
- 325- Mónaco F, Mónaco G, Andreoli M. 1975. *J Clin Endocrinol Metabol*. 41: 253
- 326- Ahn CS, Rosenberg IN. 1968. *Proc NY Acad Sci*. 60: 830.
- 327- Öfverholm T, Björkman U, Ericson LE. 1985. *Mol Cell Endocrinol* 40: 1.
- 328- Salvatore G, Stanbury JB, Rall JE. 1980. In: *The Thyroid Gland*. (De Visscher M, eds), Raven Press. New York
- 329- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Meanhaut C. 1992. *Physiol Rev* 72: 667.
- 330- Cardinali DP, Stern JE. 1994. *Brazilian J Med Biol Res*. 27: 573.
- 331- Nagataki S, Ingbar SH. In *The Thyroid*. Ingbar SH & Braverman (eds) 1986. V Edición. JB Lippincott Company. Philadelphia
- 332- Chazenbalk GD, Pisarev MA, Juvenal GJ, Kleiman de Pisarev DL, Mercuri H, De Tomas M. 1985. *Acta Endocrinol (Kbl)* 108: 72.
- 333- Boeynaems JM, Pelster D, Oates JA, Hubbard WC. 1981. *Biochem Biophys Acta*. 665: 623
- 334- Boeynaems JM, Hubbard WC. 1980. *J Biol Chem*. 225: 9001
- 335- Ambesi-Impiombato FS, Coon HG. 1979. *Int Rev Cytol* 10: 163.
- 336- Ambesi-Impiombato FS, Picone R, Tramontano D. 1982. *Cold Spring Harbor Conf Cell Prolif*. 9: 483.
- 337- Santiesteban P, Kohn LD, DiLauro R. 1987. *J Biol Chem*. 262: 4048.
- 338- Nagayama Y, Yamashita S, Hiraya H, Izumi H, Uga T, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S. 1989. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 68: 1155.
- 339- Zarrilli R, Formisano S, Di Jeso B. 1990. *Mol Endocrinol*. 4: 39.
- 340- Leer LM, Cammenga M, De Vijlder. 1991. *Mol Cell Endocrinol*. 82: R25.

- 341- Leer LM, Cammenga M van der Vorm ER, de Vijlder JJM. 1991. *Mol Cell Endocrinol.* 78: 221
- 342- Isozaki O, Tsushima T, Emoto N, Saji M, Tsuchita Y, Demura H, Sato Y, Shizume K, Kimura S, Kohn L. 1991. 128: 3113.
- 343- Derwahl M, Seto P, Rapaport B. 1990. *mol Endocrinol.* 4: 793
- 344- Ludgate M, Vassart G. 1990. *Autoimmunity* 7: 201.
- 345- Van Heuverswyn G, Leriche A, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G. 1985. *FEBS Lett.* 188: 192.
- 346- Saji M, Isozaki O, Tsushima T, Arai M, Miyakawa M, Ohba Y, Tsuchiya Y, Sano T, Shizume K. 1988 *Acta Endocrinol (Copenh).* 119: 145
- 347- Becks GP, Eggo M, Borrow GN. 1988. *Endocrinology.* 123: 545.
- 348- Filetti S, Rapaport B. 1984. *Endocrinology* 114: 1379.
- 349- Shen D.C., Wu S.Y., Chopra I.J. 1985. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 723.
- 350- Pisarev MA, Aiello LO. 1976. *Acta Endocrinol.* 82: 298.
- 351- Ogihara T., Yamamoto T, Fukuchi M., Oki K. 1972. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 711.
- 352- Bagchi N, Shivers B, Brown T. 1985. *Acta Endocrinol.* 108: 511.
- 353- Santiesteban P, Lamas I. 1981. *Acta Endocrinol (Copenh).* 98: 556.
- 354- Penel C, Rognoni JB, Bastiani P. 1987. *Am J Physiol* 253 (Endocrinol Metab16): E165.
- 355- Kim PS, Arvan P. 1993. *J Biol Chem.* 268: 4873
- 356- Chambard M, Mauchamp J, Chabaud O. 1987. *J Cel Physiol.* 133: 37.
- 357- Yamashita K, Field JB. 1970. *Biochem Biophys Res Commun* 40: 171
- 358- Dumont JE. 1971. In: *Vitamins and Hormones*, Vol 29, Eds: RS Harris, PL Munson, E Diczfalusi, J Glover (Acad Press, London).
- 359- Dumont JE, Boeynaems JM, Decoster C, Erneux C, Lamy F, Lecocq R, Mockel J, Unger J, Van Sande J. 1978. *Adv Cyclic Nucleotides Res.* 9: 723.
- 360- Menhaut C, Brabant G, Vassart G, Dumont JE. 1992. *J Biol Chem.* 267: 3000.

- 361- Lee N, Nayfeh SN, Chae C. 1989. J Biol Chem. 264: 7523.
- 362- Sherwin JR. 1978. Hormone Res 9: 271.
- 363- Heldin NE, Karlsson FA, Westermark B. 1985. Mol Cel Endocrinol. 41: 61.
- 364- Tramontano D, Veneziani BM, Lombardi A, Villone G Ingbar SH. 1989. Endocrinology 125: 984.
- 365- Laurent E Mockel J, Takazawa K, Erneux C, Dumont JE. 1989. 263: 795.
- 366- Bone EA, Ailling DW, Grollman EF. 1986. Endocrinology 119: 2193.
- 367- Kleiman de Pisarev DL, Pisarev MA. 1978. 89: 316.
- 368- Scherberg N. 1978. Biochem Biophys Res Commun. 85: 1415.
- 369- Lee N, Kamikubo K, Chai K, Kao L, Sinclair AJ, Nayfeh SN, Chae C. 1989, J Biol Chem 264: 7523.
- 370- Corvilain B, Van Sande J, Dumont JE. 1988. Biochem Biophys Res Commun. 154: 1287.
- 371- Rousset F, Poncet C, Dumont JE, Mornex R. 1980. Biochem J. 192: 801.
- 372- Rodesch F, Jortay A, Dumont JE. 1968. Experientia. 24: 268.
- 373- Chiraseveenupapund P, Rosenberg IN. 1981. Endocrinology. 109: 2095.
- 374- Doniach I. 1960. Br Med Bull. 16: 99.
- 375- Pisarev MA, Utiger RD, Salvaneschi JP, Altschuler N, DeGroot LJ. 1970. J Clin Endocrinol Metab. 30: 680.
- 376- Roger PP, Servais P, Dumont JE. 1987. J Cell Physiol. 130: 58.
- 377- Tramontano DA, Moses C, Veneziani BM Ingbar SH. 1988 Endocrinology. 122: 127.
- 378- Moris JC, III G, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE, Jiang S. 1988. Endocrinology. 123: 1385.
- 379- Bowers CW, Zigmond RE. 1981.. Neuroscience 6: 1783.
- 380- Grunditz T, Ekman R, Hakanson R., Rerup C., Sundler F., Uddman R. 1986. Endocrinology 119: 2313..
- 381- Grunditz T, Sundler F, Hakanson R., Uddman R. 1989. Adv Exp Med Biol. 261: 121.

- 382- Huffman I, Hedge GA. 1988. Life Sci. 39: 2143.
- 383- Bowers CW, Zigmond RE. 1981.6: 1783.
- 384- Romeo HE, Gonzalez-Siloveyra C, Vacas MI, Rosenstein R, Barontini M, Cardinali DP. 1986. J Autonom Nerv Syst. 17: 63.
- 385- Sundler F, Grundiz T, Hakanson R, Uddman R. 1989. Acta Histochem. 37 (suppl): 191.
- 386- Langer P, Vigas M, Kvetnansky R, Földes O, Culman Juraj. 1983. Acta Endocrinol (Copenh). 104: 443.
- 387- Lewinski A, 1991. Hormone Res. 15: 189.
- 388- Pisarev MA, Ji venal GJ, Vacas MI, Barontini M, Boado R. 1981. Endocrinology. 109: 2202.
- 389- Zerek-Melen G, Lewinski A. 1988. Acta Physiol Pharmacol Latinoam. 38: 377.
- 390- Ahren B, Bengtsson HI, Hedner P. 1986. Neuroendocrinology. 49: 471
- 391- Melander A, Ericson LE, Sundler F, Westgren U. 1975. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 73: 39.
- 392- Söderberg U. 1959. Physiol Rev. 39: 777
- 393- Melander A, Sundler F, Westgren U. 1975. Endocrinology 96: 102.
- 394- Hays MT. 1965. J Clin Endocr. 25: 465.
- 395- Barontini M, Romeo HE, Armando I, Cardinali DP. 1988. J Neural Transm. 71: 189.
- 396- Romeo H, Boado RJ, Cardinali DP. 1985. Neuroendocrinology 40: 309.
- 397- Rehnmark S, Néchard M, Herron D, Cannon B, Nedergaard J. 1990. J Biol Chem 265: 16464.
- 398- Nechard M, Nedergaard J, Cannon B. 1987. Am J Physiol. 253: C889.
- 399- Reitman C, Jakobs J. 1989. Eur J Pharmacol. 172: 211.
- 400- Marcocci C, Cohen JL, Grollman EF. 1984. Endocrinology 115: 2132
- 401- Marcocci C, Valente WA, Pinchera A, Aloj SM, Kohn LD, Grollman EF 1983. J Endocrinol Invest. 6: 463.
- 402- Saccomani G, Helander HF, Crago S, Chang HH, Dailey DW, Sachs G. 1979. J Cell Biol. 83: 271.

- 403- Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF. 1984. *Endocrinology* 114: 1090
- 404- Smallridge RC, Gist I, Ambroz C. 1991. *Endocrinology*. 129: 542.
- 405- Corda D, Kohn L. 1985. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82: 8677.
- 406- Igarashi Y, Kondo Y. 1990. *Biochem Biophys Res Commun*. 97: 759
- 407- Corda D, Marcocci C, Kohn LD. 1985. *J Biol Chem*. 260: 9230
- 408- Corda D, Kohn LD. 1986. *Biochem Biophys Res Commun*. 141: 1000.
- 409- Corda D, Kohn LD. 1987. *Endocrinology* 120: 1160
- 410- Burch RM, Luini A, Mais DE, Corda D, Vanderhoek JY, Kohn LD, Axelrod J. 1986. *J Biol Chem*. 261: 11236.
- 411- Bone E, Ailling DW, Grollman EF. 1986. *Endocrinology*. 219: 2193.
- 412- Marcocci C, Luini P, Santiesteban P, Grollman EF. 1987. *Endocrinology* 120: 1127
- 413- Okajima F, Sho K, Kondo Y. 1988. *Endocrinology*. 123: 1035
- 414- Williams JA, Malayan SA. 1975. *Endocrinology* 97: 162.
- 415- Wilson B, Raghupathy E, Tonoue T, Tong W. 1968. *Endocrinology*. 83: 877.
- 416- Knopp J, Stolc V, Tong W. 1970. *J Biol Chem*. 245: 4403.
- 417- Pratt MAC, Eggo M, Bachrach LK, Carayon P, Burrow GN. 1989. *Biochimie* 71: 227.
- 418- Berman MI, Thomas CG, Nayfeh SN. 1987. *Arch Biochem Biophys*. 253: 249.
- 419- Rani CSS, Field JB. 1988. *Endocrinology*. 122: 1915
- 420- Marcocci C, Cohen JL, Grollman EF. 1984. *Endocrinology* 115: 2123.
- 421- Motoyasu S, Kohn LD, . 1990. *Endocrinology*. 127: 1867.
- 422- Maayan ML, Ingbar SH. 1968. *Science* 162: 124.
- 423- Maayan ML, Volpert EM, From A. 1981. *Endocrinology* 109: 930.
- 424- Maayan ML, Ingbar SH. 1970. *Endocrinology* 87: 588.
- 425- Björman U, Ekholm R, Denef VF. 1981. *J Ultrastructure Res* 74: 105.
- 426- Pisarev MA, Cardinali DP, Juvenal GJ, Vacas MI, Barontini M, Boado RJ. 1981. *Endocrinology* 109: 2202

-
- 427- Cardinali DP, Romeo H, Boado RJ, Deza S. 1986. *J Atonom Nerv Syst.* 16: 13.
- 428- Ahren B, Bengtsson HI, Hedner P. 1986. *Endocrinology* 119: 1058.
- 429- Huffman LJ, Connors JM, White BM, Hedge GA. 1988. *Neuroendocrinology* 47: 567.
- 430- Philp JR, Crooks J, MacGregor AG, McIntosh JAR. *Br J Cancer* 23: 515.
- 431- Redmond O, Tuffery AR. 1978. *J Anat.* 127: 353.
- 432- Christov K. 1985. *Cell Tissue Kinet.* 18:119
- 433- Speight JW, Baba WI, Wilson GM. 1968. *J Endocrinol.* 41: 577.
- 434- Mulcachi RT, Rose DP, Miteken JM, Clifton KM. 1980. *Endocrinology* 106: 1769.
- 435- Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, Carrasco N. 1994. *Biochemistry* 91: 3789.
- 436- Vander J B, Gaston E A, Dawber T R. 1968. *J. Nucl. Med.* 32: 2181.
- 437- Mortensen J.D., Woolner L.B., Bennett W.A.. 1955. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 15: 1270
- 438- Brander A, Viikinkoski P, Nickels J, Kivisaari L. 1991. *Radiology.* 181: 683.
- 439- Gharib H.1994. *TEM.* (5). 9: 365.
- 440- Ashcraft M W, Van Herle A J. 1981. *Head Neck* 3: 216.
- 441- Reading C C, Gorman C A. 1993. *Clin. Lab. Med.* 13: 711.
- 442- Gharib H, Goellner J R.1993. *Ann. Inter. Med.* 118: 282
- 443- Cersosimo E, Gharib H, Suman V J, Goellner J R. 1993. *Mayo Clin Proc.* 68: 343.
- 444- Gharib H, GoellnerJ R, Zinsmeister A R, Grant C S, van Heerden J A. 1984. *Ann Inter. Med.* 101: 25.
- 445- Nagayama Y,Kaufman K D< Seto P, Rappaport B. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.* 165: 1184
- 446- Libert F, Lefort A, Gerard C, Parmentier M, Perret J, Ludgate M, Dumont J E, Vassart G. 1989. *Biochem Biophys Res Commun.* 165: 1250
- 447- Kimura S, Kotani T, McBride O W, Umeki K, Hirai K, Ohtaki S. 1987. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 5555.

- 448- Di Lauro R, Obici S, Condliffe D, Ursini V M, Musti A, Moscatelli C, Avvedimento VE. 1985. Eur J Biochem 148:7.
- 449- Perrin F, Jarry B, Lissitzky S. 1981. Eur J Biochem. 120: 1
- 450- Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. EMBO J. 1990. 9:3631.
- 451- Hoang-Vu C, Dralle H, Scheumann G, Meanhaut C, Horn R, von sur Mühlen A, Brabant G. 1992. Exp Clin Endocrinol. 100: 51
- 452- Pacini F, Pinchera A, Giani C, Grasso L, Doveri F, Baschieri L. 1980. Endocrinol Invest 3: 283.
- 453- Berge-LeFranc JL, Cartouzou G, de Mico C, Fragu P, Lissitzky S. 1985. Cancer 56: 345
- 454- Brabant G, Meanhaut C, Köhrle J, Sceuman G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE. 1991. Mol Cell Endocrinol. 82: R7
- 455- Otha K, Endo T, Onaya T. 1991. Biochem Biophys Res Commun. 174: 1148
- 456- Elisei R, Pinchera A, Romei C, Gryczynska M, Pohl V, Meanhaut C, Fugazzola L, Pacini F. 1994. J Clin Endocrinol Metabolism. 78: 867
- 457- Ashcraft MW, Van Herle AJ. 1981 Am J Med. 71: 806
- 458- Goldman JM, Line BR, Aamodt RL, Robbins J. 1980. J Clin Endocrinol Metab 50: 734.
- 459- Pacini F, Pinchera A, Giani C, Grassso L, Baschieri L. 1980 Clin Endocrinol (Oxf). 13: 107.
- 460- Pacini F, Pinchera A, Giani C, Grassso L, Doveri F, Baschieri L. 1980 J Endocrinol Invest. 3: 283.
- 461- Valenta L, Lemarchand-Beraud T, Nemec J, Grissen M, Bednar J. 1970. Am J Med. 48: 72.
- 462- Mazzaferri E. 1981. Annu Rev Med. 32: 73
- 463- Hay ID. 1990. Endocrinol Metab Clin N Am. 19: 545.
- 464- Mitchaell PJ, Tijian R. 1989. Science (Washington DC). 245: 371.
- 465- Francis-Lang H, Price M, Policarpou-Schuwarz M, Di Lauro R. 1992. MollCell Biol. 12: 576.

-
- 466- Avvedimento VE, Musti AM, Fusco A, Bonapace MJ, Di Lauro R. 1988. Proc Natl Acad Sci USA. 85: 1744.
- 467- Colleta G, Pinto A, Di Fiore PP, Fisco A, Ferretino M, Avvedimento VE, Tschuida N, Vecchio G. 1983. Mol Cell Biol. 3: 2099.
- 468- Avvedimento VE, Obici S, Sanvhez M, Gallo A, Musti AM, Gottesman M. 1989. Cell. 58: 1135.
- 469- Avvedimento VE, Musti AM, Ueffing M, Obici S, Gallo G, Sanchez M, DeBrasil D, Gottesman E. 1991. Genes Dev. 5: 22.
- 470- Fabbro D, Di Loretto C, Beltrami CA, Belfiore A, Di Lauro R, Damante G. 1994. Cancer Research. 54: 4744.
- 471- Weinberg RA. 1989. Cancer Research. 49: 3713.
- 472- Shi YF, Zou MJ, Schmidt H, Juhasz F, Stenszky V, Robb D, Farid NR. 1991. Cancer Research. 51: 2690
- 473- Bond J, Dawson T, Lemoine N, Wynford-Thomas D. 1992. Mol Carcinog. 5: 129.
- 474- Gerard C, Lefort A, Christophe D, van Sande J. 1989. Mol Endocrinol. 3: 2110.
- 475- Meanhaut C, Brabant G, Vassart G, Dumont JE. 1992. J Biol Chem. 267: 3000.
- 476- Nagasaka A, Hidaka H, Ishizuki Y. 1975. Clin Chim Acta. 62:1
- 477- Valenta LJ. 1976. J Clin Endocrinol Metab. 43:466.
- 478- Fragu P, Nataf BM,. 1977. J Clin Endocrinol Metab. 4: 1089
- 479- Nakashima T, Taurog A. 1978. Clin Chim Acta. 83: 129.
- 480- Mizukami Y, Matsubara F. 1981. Endocrinol Jpn. 28: 381.
- 481- Yamamoto M, Saito S, Kaise K, Kaise N, Yoshinaga K. 1979 Metabolism. 28: 659
- 482- Takamatsu J, Hosoya T, Tsuji M, Yamada M, Murakami Y, Sakane S, Kuma K, Ohsawa N. 1992. Thyroid 2: 193.
- 483- Schürch M, Peter HJ, Gerber H, Studer H. 1990. J Clin Endocrinol Metab. 71: 1224.
- 484- Dumont JE, Vassart G, Refetoff S. 1989. McGraw Hill, New York, pp 1843.

- 485- Kusakabe T. 1975. *Metabolism* 24: 1103
- 486- Nunez J, Pommier J. 1982. *Vitam Horm.* 39: 175.
- 487- Neary RT, Nakamura C, Davidson B, Vickery AL, Maloof F. 1978. *J Clin Endocrin Metab.* 46: 791.
- 488- Yamasaki Y, Mori K, Naito M, Akagi M. 1990. *Am J Surg.* 160: 271.
- 489- De Micco C, Chrestian MA, Henry JF. 1991. *Cancer.* 67: 3036.
- 490- Christophe D, Cabrer B, Bacolla A, Targovnik H, Pohl V, Vassart G. 1985. *Nucl Acid Res.* 13: 5127.
- 491- Greer MA, DeGroot LJ. 1956. *Metabolism.* 5: 682.
- 492- Ouchterlony Ö. 1962. In *Progress in Allergy*, Vol V, pp1-78, ed. Kallós P & Waksman BH. Basel and New York: Karger. Ouchterlony Ö. 1962. *Acta Path Microbiol. Scan Suppl.* 154: 252.)
- 493- Elek S.D. 1948. *Brit Med. J.* i: 493.
- 494- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. *Anal Biochem.* 162: 156.
- 495- Graham FL, van der Eb AJ. 1973. *Virology* 52: 456
- 496- Labarca C, Paigen K. *Analyt Biochem.* 1980. 102: 344.
- 497- Cardinali DP, Faigon MR, Scacchi P, Moguilevsky J. 1979. *J Endocrinol.* 82: 315
- 498- DeGroot LJ, Davies AM. 1962, *Endocrinology.* 70: 492.
- 499- Snedecor GW, Cochran WG, 1967. The Iowa State University Press. Ames IA: 593.



LISTA DE ABREVIATURAS

ActD	actinomicina D
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
°C	grados centígrados
CAT	cloranfenicol acetil transferasa
CI	carcinoma indiferenciado
cm	centímetros
cpm	cuentas por minuto
D	Dalton
DAG	diacilglicerol
DIT	diiodotirosina
DOG	2-deoxiglucosa
dpm	descomposiciones por minuto
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FNA	aspiración con aguja fina
FRTL	línea celular de tiroides de ratas Fisher
G	Graves
GCI	ganglio cervical inferior
GCM	ganglio cervical medio
GCS	ganglio cervical superior
GCSx	gangliectomía cervical superior
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
h	horas
H	Hashimoto
IGF	factor de crecimiento tipo insulina
IgG	inmunoglobulina G
IP ₃	inositol trifosfato
K _m	constante de Michaelis-Menten
M	Molar
mCi	milicurie
μCi	microcurie
mg	miligramo
μg	microgramo
min	minutos
MIT	monoiodotirosina
ml	mililitro
μl	microlitro
mM	milimolar
μM	micromolar
MMI	metilmercapto imidazol
mU	miliunidades
μU	microunidades
N	Normal
NE	norepinefrina (3,4-dihidroxifeniletanolamina)

NF	nódulo frío
ng	nanogramos
NI	nódulo de captación irregular
NPY	neuropéptido Y
NT	nódulo tibio
PAGE	gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PI	fosfoinosítidos
pKC	proteína quinasa C
PLC	fosfolipasa C
PTU	propiltiouracilo
RIA	radioinmunoanálisis
rpm	revoluciones por minuto
rT3	T3 reversa
rTSH	receptor de TSH
SNS	sistema nervioso simpático
T3	3,5,3'-triiodotironina
T4	tetraiodotironina o tiroxina
TCA	ácido tricloroacético
Tg	tiroglobulina
TGF-B	factor de crecimiento tumoral B
TLC	cromatografía en capa delgada
TPA	ésteres de forbol
TPO	tiroperoxidasa
TRH	factor de liberación de TSH
TSH	tirotrófina
TSI	inmunoglobulinas tiroestimulantes
TTF	factor de transcripción tiroideo
U	unidades
UFA	factor de transcripción ubicuo A
UFB	factor de transcripción ubicuo B
VIP	péptido vasoactivo
Vm	velocidad máxima
xg	aceleración de la gravedad

INDICE

INTRODUCCION

La Glándula Tiroides.....	1
1. Las Hormonas Tiroideas.....	4
2. Regulación de la Función Tiroidea.....	9
2.1. La Tirotrofina.....	10
2.2. El Iodo.....	18
2.3. Inervación Simpática Tiroidea.....	26
2.4. Otros Moduladores.....	33
La Glándula Tiroides en	
Condiciones Patológicas.....	36
Objetivos.....	42

MATERIALES Y METODOS

1. Modelos Experimentales	
1.1. Células FRTL-5.....	45
1.1.1. Componentes del medio.....	45
1.1.2. Repiques.....	46
1.1.3. Congelamiento y descongelamiento..	47
1.1.4. Tratamientos.....	47
1.2. Animales y Tejidos	
1.2.1. Ratas.....	48
1.2.2. Conejos.....	48
1.2.3. Piezas operatorias	
de tiroides humanas.....	48

2. Diseños experimentales y Metodologías	
2.1. Purificación de Tg de tiroides de rata.....	49
2.2. Protocolo de inmunización del conejo con Tg de rata.....	50
2.3. Ouchterlony.....	50
2.4. Marcación con pulsos de ³⁵ S-metionina.....	51
2.4.1. Caracterización electroforética de las proteínas inmunoprecipitadas con el suero hiperinmune obtenido...	51
2.4.2. Cuantificación de la incorporación de ³⁵ S-metionina en células FRTL-5.	52
2.4.3. Estudio de la liberación de proteínas marcadas con ³⁵ S-metionina.....	53
2.5. Determinación de AMPc.....	54
2.6. Estudios del contenido de ARN total y ARNm.....	54
2.6.1. Purificación de ARN total.....	55
2.6.2. Dot Blot y Northern Blot.....	56
2.7. Ensayos de transfección.....	57
2.7.1. Actividad de CAT.....	58
2.8. Ensayos de captación y liberación de ¹²⁵ I.....	59
2.8.1. Captación de ¹²⁵ I.....	59

2.8.2. Liberación de ^{125}I	60
2.8.3. Determinación de los parámetros cinéticos del transportador de iodo.....	60
2.9. Evaluación del crecimiento.....	60
2.9.1. Determinación de ADN.....	60
2.10. Captación de ^3H -deoxiglucosa.....	61
2.11. Captación de ^3H - α -aminoisobutírico.....	61
2.12. Tratamiento de ratas	
2.12.1. Determinación del efecto de iodo sobre la actividad de TPO.....	62
2.12.2. Determinación del efecto de la desnervación simpática unilateral crónica sobre la actividad de TPO.....	63
2.13. Determinación de la actividad de TPO..	64
2.14. Análisis estadístico de los datos.....	65

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Modulación de la respuesta tiroidea a TSH.....	69
1.1. Efectos del yoduro sobre distintos aspectos de la función tiroidea.....	71
1.1.1. Síntesis de Tg.....	72
1.1.2. Actividad de TPO.....	90
1.1.3. Crecimiento.....	93
1.2. Modulación noradrenérgica de distintos aspectos de la función tiroidea.....	97

1.2.1. Captación de ^{125}I	99
1.2.2. Síntesis de Tg.....	114
1.2.3. Actividad de TPO.....	117
1.2.4. Crecimiento.....	121
2. Estudio de potenciales marcadores de diferenciación en diversas patologías tiroideas.....	125
 CONCLUSIONES.....	 140
 BIBLIOGRAFIA.....	 150
 ABREVIATURAS.....	 177



Guillermo B. Piegrosso
Guillermo B. Piegrosso

G. Fuenzalida
G. Fuenzalida

M. Pizarro
M. Pizarro

Y ahora?

***Obscurum per obscuris
Ignotum per ignotius***

Divisa alquímica:

**"A lo oscuro, por lo más oscuro
a lo desconocido, por lo más desconocido"**

